

**CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIALEN
DNS AUS SACHAROMYCES CEREVISIAE:
RHO⁻ BILDUNG IN TEMPERATUR SENSIBLEN
MUTANTEN**

Ilias Doxiadis

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIALEN DNS AUS SACCHAROMYCES
CEREVISIAE: RHO^- BILDUNG IN TEMPERATUR SENSIBLEN MUTANTEN

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von

Ilias Doxiadis

München 1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung 17. 7. 1978

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1 - 4
MATERIAL UND METHODEN	5 - 20
1. Stämme	5
2. Medien	5
3. Puffer	5
4. Chemikalien, Enzyme und Radioaktive Isotope . . .	10
5. Züchtung der Mikroorganismen	10
6. Radioaktive Markierung der Mikroorganismen DNS . .	11
7. Protoplastierung der Hefezellen	11
8. Lyse der Mikroorganismen bzw. Mitochondrien . . .	12
9. Phenol-Extraktion der Mikroorganismen DNS	12
10. Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen . . .	12
11. Reinigung der Mitochondrien	13
12. Isolierung von DNS	14
13. Dichtezentrifugation zur Isolierung der Mikro- organismen DNS	15
14. Sedimentations-Gradienten	16
15. Entfernung von Eth. Br. oder DAPI aus der DNS . .	17
16. Behandlung von radioaktivmarkierter DNS aus den Gradienten	17
17. Agarose-Gel-Elektrophorese	18
18. Isolierung von DNS aus dem Gel	18
19. Übertragung der DNS-Bande auf Cellulose-Nitrat- Filter	19
20. <u>mit</u> -c-RNS Synthese	19
21. Hybridisierung mit <u>mit</u> -c-RNS	19

22. Berechnung des Molekulargewichts der DNS in	
Sucrose-Sedimentations-Gradienten	20
23. Abkürzungen	20
ERGEBNISSE	21 - 51
1.1. Dichte-Gradienten-Zentrifugation	21
1.2. Molekulargewichtsbestimmung der <u>mit</u> DNS	23
1.2.1. Dichte der DNS aus Sucrose-Gradienten	24
1.3. Zellaufschluß	25
1.3.1. Mechanische Methoden zur Gewinnung von	
<u>mit</u> DNS	25
1.3.2. Vergleich beider Methoden	27
2. Vergleich verschiedener Methoden zur Trennung	
von <u>mit</u> und <u>nuc</u> DNS	27
2.1. Dichtezentrifugation	27
2.1.1. Dichtezentrifugation mit CsCl / DAPI	28
2.1.1.1. Entfernung von DAPI aus der DNS	29
2.1.2. Dichtezentrifugation mit NaJ	30
2.2. Sedimentations-Gradienten	31
2.3. Gelelektrophoretische Methode zur Isolierung	
von <u>mit</u> DNS	32
2.3.1. Nachweis von DNS im Gel	33
2.3.2. Nachweis von <u>mit</u> DNS im Gel	34
2.3.2.1. Dichtebestimmung	34
2.3.2.2. Hybridisierung der in der Bande enthaltenden	
DNS mit <u>mit</u> -c-RNS	35
2.3.3. Molekulargewichtsbestimmung der <u>mit</u> DNS im Gel	36
2.4. Zusammenfassung	37
3. Untersuchung der <u>mit</u> DNS von Mutanten	38

3.1.	Untersuchungen an der Mutante tsm-8	39
3.2.	Dichtezentrifugation der <u>mit</u> DNS aus der Mutante tsm-8	40
3.3.	Restriktionsanalyse der <u>mit</u> DNS aus der Mutante tsm-8	42
3.4.	Dichtezentrifugation von <u>mit</u> DNS der kariotischen Mutanten	43
3.5.	Charakterisierung der <u>mit</u> DNS isolierter ρ^- Mutanten	44
3.6.	Verhalten der Mutanten in nicht-vergärbarem Substrat	46
3.7.	<u>mit</u> DNS Synthese in sich nicht-teilenden Zellen der Mutante tsm-8	47
3.7.1.	Hemmung der <u>nuc</u> DNS Synthese	48
3.7.2.	<u>mit</u> DNS Synthese der Mutante tsm-8	48
3.8.	Molekulargewichtsbestimmung von <u>mit</u> DNS der Mutanten tsm-8 nach Inkubation in nicht- vergärbarem Substrat	49
3.8.1.	Untersuchung der Proteinbindung an die <u>mit</u> DNS	50
DISKUSSION		52 - 61
ABBILDUNGEN, PHOTOS UND TABELLEN		62 - 105
LITERATURVERZEICHNIS		106 - 116
ZUSAMMENFASSUNG		117 - 118

EINLEITUNG

Das stoffliche Äquivalent des mitochondrialen Genoms der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae ist ein ringförmiges DNS-Molekül von 25 μ m Länge (Hollenberg et al. (1970)). Sedimentations- (Blamire et al. (1972)) und Restriktions-Analysen (Sanders et al. (1975)) dieser DNS erbrachten ein Molekulargewicht von etwa 50 Megadalton, Dichtezentrifugationen eine spezifische Schwimmdichte von 1,683 g / ccm in CsCl, was einem G + C Gehalt von 18 % entspricht (Bernardi et al. (1970)). Für Saccharomyces cerevisiae sind bislang keine Anhaltspunkte über den Modus der mitochondrialen DNS Replikation gegeben. Rückschlüsse aus Ergebnissen bei anderen Organismen verbieten sich wegen der Fülle der unterschiedlichen Befunde.

Der Replikationsmodus der mitDNS höherer Organismen erweist sich dabei als sehr heterogen. mitDNS Moleküle aus Rattenleber wie HeLa-Zellen replizieren unidirektional und asymmetrisch nach dem Cairns Modell, d.h. beide Schwesternstränge replizieren unabhängig voneinander, wobei die Replikase in einer Richtung synthetisiert (Kasamatsu und Vinograd (1974)). Tetrahymena mitDNS wird bidirektional repliziert (Arnberg et al. (1974)).

Die Kodierungskapazität der mitDNS wurde von Prunell und Bernardi (1977) mit etwa 70 Genen errechnet. Die Kartierung einer Reihe mitochondrialer Mutanten (Resistenz-Mutanten gegen Antibiotika oder Mutanten, die funktionelle Defekte der Atmungskette aufweisen) steht mit der Ringform des mitochon-

- -

drialen Genoms im Einklang (Thomas und Wilkie (1968); Avner et al. (1973); Wolf et al. (1973); Handwerker et al. (1973); Kutzleb et al. (1973); Dujon und Michaelis (1974); Tzagoloff et al. (1975); Schweyen et al. (1977) und Bolotin-Fukuhara et al. (1977)). Bislang konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß mindestens 25 rRNS, 2 rRNS und 5 Polypeptide mitochondrial kodiert sind (Cabral et al. (1978); Butow et al. (1977); Wachter et al. (1977); Borst et al. (1977)). Die für die Kartierung verwendeten Mutanten zeigen einen oder wenige Ausfälle mitochondrialer Funktionen (Linnane et al. (1976); Mironiucki und Tzagoloff (1976); Schweyen et al. (1977)). Im Gegensatz dazu treten häufig Mutanten auf, die pleiotropes Fehlen dieser Funktionen aufweisen (Verlust der mitochondrialen Protein-Synthese und damit Verlust der Cytochrome aa₃, b, c₁ und der Atmung). Sie zeigen, als rho⁻ bezeichnet, einen teilweisen oder (rho⁰ genannt) völligen Verlust der mitDNA (Nagley und Linnane (1970); Goldring et al. (1970)). Faye et al. (1973) und Locker et al. (1974 a,b) konnten nachweisen, daß die rho⁻ Mutanten Makrodeletionen der rho⁺ mitDNA und Reiteration der zurückgehaltenen Sequenzen bis hin zur ursprünglichen Länge von 25 µm aufweisen. In allen Stämmen von Saccharomyces cerevisiae treten solche rho⁻ Mutanten mit einer stammspezifisch unterschiedlichen spontanen Häufigkeit auf. Sie liegt zwischen 40 und 0,1 % je Zellgeneration. DNS-bindende und / oder interkalierende Agenzien wie z.B. Ethidium Bromid (Eth. Br.) steigern den rho⁻ Anteil in der Gesamtpopulation bis zu 100 %. Ähnliche Ergebnisse können mit Hilfe von konditionellen Mutanten erzielt werden (Handwerker et al. (1973); Weislogel und Butow (1970); (1971);

Butow (1973); Backhaus et al. (1978)). Drei karyotisch (Backhaus et al. (1978)) und eine mitochondrial (Handwerker et al. (1973)) kodierte Mutante wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht, um Aussagen über die ρ^- Entstehung zu gewinnen. Bei Wachstum der Zellen in vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur (35°C) gehen innerhalb 5 - 8 Zellgenerationen nahezu 100 % in den ρ^- Zustand über. Mit der ρ^- Bildung geht dabei ein massiver Verlust genetischer Informationen der mitNS einher. Im Gegensatz dazu, weisen die Mutanten in nicht vergärbarem Substrat bei der erhöhten Temperatur kein Wachstum auf. Sie scheinen in ein Stadium überzugehen, das dem stationärer Zellen ähnlich ist. Mit diesen Mutanten ist es möglich, den Vorgang der ρ^- Bildung und damit den Übergang von ρ^+ mitNS zu ρ^- mitNS zu beobachten. Diese Untersuchungen setzen die Gewinnung von reiner und möglichst unveränderter mitNS aus Hefezellen voraus, was sich als sehr schwer erweist. Eine Vielzahl von Präparationsmethoden zur Isolierung von mitNS sind publiziert worden (Blamire et al. (1972); Williamson et al. (1971); Wintersberger et al. (1974); Christiansen et al. (1974); Bernardi et al. (1974); Grossman et al. (1969); Williamson und Fenell (1975)), ohne voll zufriedenstellende Ergebnisse erbracht zu haben. Die mitNS Präparationen waren größtenteils sehr heterogen bezüglich Reinheit und Molekulargewicht und enthielten nur geringe Teile der in den aufgeschlossenen Zellen enthaltenen Gesamt mitNS. Zudem erforderten die meisten bekannten Methoden großen Zeit- und Materialaufwand.

Teilziel der Arbeit war zunächst, Methoden der mitNS Gewinnung

zu verbessern. Dazu wurden bekannte Präparationsmethoden in verschiedenen Variationen studiert und schließlich ein methodisch völlig neues Darstellungsverfahren entwickelt. Folgende Kriterien wurden für die Prüfung der Methoden angewandt:

- 1) Reinheit der isolierten mitDNS
- 2) Molekulargewicht der gewonnenen DNS
- 3) Ausbeute an DNS
- 4) Zeit- und Material-Aufwand der angewandten Methode.

Mit Hilfe der Methoden sollten anschließend Aussagen über den Mechanismus der ρ^- Entstehung bei den konditionellen Jutan-ten getroffen werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Stämme:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tab. 1 aufgeführt.

2. Medien:

2.1. YPD-Medium:

Hefe-Extrakt	10 g
Universal-Pepton	10 g
Glucose	30 g
H ₂ O-dest	ad 1 l

Die Glucose wurde nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.2. YPG-Medium:

Wie YPD-Medium, jedoch anstellen von Glucose 30 ml Glycerin zugeben

2.3. Glucose-Minimal-Medium:

Difco Yeast Nitrogen Base	7 g
Caseinhydrolysat	3 g
Glucose	30 g
H ₂ O-dest	ad 1 l

2.4. Glycerin-Minimal-Medium:

Wie das Glucose-Minimal-Medium, jedoch anstelle von Glucose 30 ml Glycerin zusetzen

2.5. Phosphatarme-Medien:

Nach Herstellung der Medien wurde der pH durch Zugabe von NaOH auf 9 erhöht. Das im Medium befindliche orga-

nische Phosphat wurde durch Zugabe von $MgCl_2$ gefällt, durch Filtration anschließend entfernt, das Filtrat auf pH 6,2 zurückgestellt und zur Vermeidung von Kontamination autoklaviert.

2.6. TNA-Medium:

Difco Bacto Trypton	10 g
NaCl	8 g
Glucose	1 g
H ₂ O-dest	ad 1 l
pH auf 7 einstellen	

Für die Verwendung von Platten wurde das jeweilige Medium mit 1,5% Agar versetzt.

3. Puffer:

3.1. Phosphat-Puffer pH 6,2:

KH ₂ PO ₄	408,27 g	ad 3 l H ₂ O-dest
K ₂ HPO ₄	283,92 g	ad 2 l H ₂ O-dest
Lösungen mischen und pH einstellen.		

3.2. TGM-Puffer pH 9,3:

Na-thioglycolat	11,5 g
Tris-Base	2,42 g
H ₂ O-dest	ad 1 l
pH durch Zugabe von NaOH einstellen.	

3.3. AM-Puffer pH 5,8:

Sorbitol	270 g
EDTA	0,372 g
Citronensäure	2,1 g

K_2HPO_4	1,14 g
H_2O -dest	ad 1 l

3.4. BM-Puffer pH 6,4:

Sorbitol	270 g
EDTA	0,372 g
H_2O -dest	ad 1 l

3.5. Elektrophorese-Puffer pH 8,3 (50-fach):

Tris-Base	242,2 g
Na-acetat	136,1 g
EDTA	37,224 g
H_2O -dest	ad 1 l
pH mit Essigsäure einstellen.	

3.6. Dialyse-Puffer für DNS pH 8:

Tris-HCl pH 8	5 mM
EDTA pH 8	1 mM
$MgCl_2$	2 mM
DTT	1 mM

3.7. Knack-Puffer pH 6,5:

Sorbitol	162 g
EDTA	3,722 g
H_2O -dest	ad 1 l

3.8. Sucrose-Lösung Ia:

Sucrose	25 g
NaCl	5,84 g
Tris-HCl pH 8	20 mM
EDTA pH 8	1 mM

3.13. Lysis-Puffer für Mitochondrien pH 8:

NaCl	5,84 g
Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA pH 8	50 mM
Sarkosyl	2 g
H ₂ O-dest	ad 100

3.14. Phagen-Puffer pH 7,2:

Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM

3.15. Standard-Saline-Citrat-Puffer pH 7,95:

NaCl	8,766 g
Na-citrat	4,412 g
H ₂ O-dest	ad 1 l

3.16. c-RNS Synthese-Mix:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Mg-acetat	20 mM
GTP	1 mM
CTP	1 mM
KCl	250 mM
DNS	5 µg
RNS-Polymerase	20 µg
³ H UTP / ³ H ATP	50 µCi
Endvolumen	250 µl.

3.17. Neutralisations-Mix:

NaCl	0,5 M
------	-------

HCl	0,12 M
Tris-HCl pH 7,5	0,125 M

3.18. Lysis-Mix:

Sarkosyl	2 g
Nadeoxycholatl	3 g
SDS	5 g
H ₂ O-dest	100 ml

3.19. Phenol-Mix:

Hydroxichinolin	0,1 g
m-Kresol	10 ml
H ₂ O-dest	12,5 ml
Destiliertes Phenol	ad 100 ml

3.20. Scintillations-Mix:

PPO	4 g
Dimethyl POPOP	0,1 g
Toluol	1 l

4. Chemikalien, Enzyme und Radioaktive Isotopen:

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) verwendet. Enzyme wurden von den Firmen Miles GmbH (Frankfurt / Main) und Boehringer (Mannheim), die radioaktiven Isotope von der Firma Amersham-Buchler und Co KG (Braunschweig / Wenden) geliefert.

5. Züchtung der Mikroorganismen:

Soweit nicht anders angegeben, wurden Hefezellen bei 23°C

unter Belüftung oder Schütteln gezüchtet, *Escherichia coli* Zellen bei 30°C gezogen.

6. Radioaktive Markierung der Mikroorganismen DNS:

Die Verwendung der radioaktiven Isotope ^3H und ^{14}C erfolgte in Glucose- oder Glycerin-Minimal-Medium. Bei Markierung mit ^{32}P wurde Phosphatarmes-Medium benutzt.

7. Protoplastierung der Hefezellen:

Für die Protoplastierung der Hefezellen fand die Methode von Kováč et al. (1972) in abgeänderter Form Verwendung. Zellen der mittlogarithmischen Phase (vgl. Abb. 1) wurden abzentrifugiert (3 000 x g; 5 min; 4°C), das Pellet einmal mit Phosphat-Puffer pH 6,2 gewaschen und anschließend in TGM-Puffer pH 9,3 aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 25°C (soweit nicht anders angegeben) für 10 - 15 min unter Schütteln gehalten, danach abzentrifugiert (s.o.) und mehrmals mit Phosphat-Puffer pH 6,2 gewaschen. Anschließend wurden sie mit AM-Puffer pH 5,8 behandelt, abzentrifugiert, im selbigen Puffer wieder aufgenommen und Helicase (β -Glucoronidase, Arylsulfatase) zu einer Endkonzentration von 5% - 10% zugegeben. Die Einwirkdauer betrug je nach Zustand der Zellen und je nach benütztem Stamm 5 - 60 min. Die Unterbrechung der Enzymreaktion erfolgte, wenn etwa 60 - 80% der Zellen lichtmikroskopisch als Protoplasten zu erkennen waren. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (1 500 x g; 7 min; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit BM-Puffer pH 6,4 gewaschen.

7.1. Rückgewinnung der Helicase:

Für die Rückgewinnung der Helicase wurde die Methode von Schatz und Kováč (1974) angewandt. Der Überstand nach der Protoplastierung der Hefezellen wurde gesammelt und bei 100 000 x g abzentrifugiert. Die Überstandproteine konnten mit 39,8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt werden und bei 4°C aufbewahrt. Kurz vor einer neuerlichen Benützung der Helicase wurde das gefällte Enzym bei 12 000 x g abzentrifugiert und in AM-Puffer pH 5,8 wieder aufgenommen.

8. Lyse der Mikroorganismen bzw Mitochondrien:

Die Protoplasten oder Mitochondrien wurden unter Zugabe von Detergenz bei 60°C für 10 - 15 min lysiert.

9. Phenol-Extraktion der Mikroorganismen DNS:

Zur Entfernung von Proteinen aus der DNS wurde das Mikroorganismen bzw Mitochondrien-Lysat mit einem gleichen Volumen an Phenol gemischt und nach einer Rührzeit von 5 min abzentrifugiert (2 000 x g; 5 min; 20°C). Die wässrige Phase wurde nochmals mit Phenol behandelt und anschließend mit einem Gemisch von Chloroform und Isoamylalkohol (24 + 1) versetzt und, wie oben beschrieben, behandelt. Die nach dem Zentrifugationsschritt entstandene wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren.

10. Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen:

10.1. Nach einer Protoplastierung:

Hefe-Protoplasten wurden in 0,6 M Sorbitol Puffer pH 6,2 aufgenommen und bei 0°C gepottert. Dabei lysieren die Pro-

toplasten ohne Lyse der Mitochondrien. Nach einer fraktionierten Zentrifugation (1 000 x g; 3 min; 3 000 x g; 5 min; und 18 000 x g; 20 min) werden die Mitochondrien isoliert.

10.2. Direkt:

Diese Methode von Lang, Burger, Doxiadis, Thomas, Bandlow und Kaudewitz (1977) wurde angewendet, um grössere Mengen an Mitochondrien in kürzester Zeit zu isolieren. Hefe der mittlogarithmischen Phase bzw. der späten stationären Phase wurden in einer IEC Zentrifuge sedimentiert (3 000 x g; 15 min; 4°C), in Knack-Puffer pH 6,5 aufgenommen, mit Glasperlen (0,4 - 0,5 mm Durchmesser) gemischt und bei 4°C in einer 1 l Merckflasche geschüttelt. Zum Aufbrechen von 50 - 70% der Zellen ist je nach Zustand und je nach Stamm 2 - 15 min Schütteln nötig. Die Suspension wurde anschließend abzentrifugiert (48 000 x g; 20 min; 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet, das aus zwei Schichten besteht (vgl. Abb. 2), wurde mit STE-Puffer pH 6,2 versetzt und auf einem Vortex-Mischer 30 sec lang geschüttelt. Die obere Schicht wird dabei aufgewirbelt, die untere bleibt als Pellet bestehen. Die Mitochondrien sind aus dieser Suspension mit einer anschließenden Zentrifugation (19 000 x g; 15 min; 4°C) als Pellet zu isolieren.

11. Reinigung der Mitochondrien:

Für die Reinigung der Mitochondrien wurden Urografin-Dichte-Gradienten verwendet. Das Mitochondrienpellet wurde in Sorbitol-Puffer pH 6,2 aufgenommen und auf einen 40 - 60% Urografin-Dichte-Gradienten geschichtet. Nach

einer Zentrifugationsdauer von 45 min bei 27 000 Upm (SW 27 Rotor) konnte eine dunkelbraune Bande im unteren Drittel des Gradienten gesehen werden. Nach Abpipettieren der Bande und einer nochmaligen Zentrifugation (18 000 x g; 20 min; 0°C) konnten die Mitochondrien als Pellet gewonnen werden.

12. Isolierung von λ -DNS:

12.1. Züchtung der λ -Phagen:

Durch Zugabe von frischem TNA-Medium zu einer Übernachtkultur des E. coli Stammes C 600 suIII⁺ wurde das Volumen der Kultur verdoppelt. Nach Weiterzüchten bis zu einer optischen Dichte von 0,65 Klett Einheiten wurde die Temperatur der Kultur auf 42°C erhöht (Phageninduktion). Nach einer Behandlungsdauer von 10 min wurde die Temperatur auf 37°C zurückgestellt (Phagenvermehrung). Durch Beobachtung der optischen Dichte konnte festgestellt werden, ob eine Volumenvergrößerung der Zellen erfolgte (vgl. Abb. 3). Nach Erreichen eines konstanten Wertes (0,73 Klett Einheiten) über längere Zeit (60 min) wurde die Kultur zentrifugiert (6 000 x g; 10 min; 4°C), das Pellet in Phagen-Puffer pH 7,2 + CHCl₃ (10 : 1) aufgenommen und bis zur vollständigen Lyse der Bakterien geschüttelt.

12.2. Isolierung von Phagen aus dem Lysat:

Die Phagen wurden aus dem Lysat mittels einer Zentrifugation in einem CsCl-Schichtgradienten (1,7; 1,5; und 1,4 g / ccm) isoliert.

12.3. Lyse der Phagen und Isolierung der DNS:

Nach Dialyse der Phagen gegen Phagen-Puffer pH 7,2 wurde die Suspension mit SDS (2% Endkonzentration) versetzt und für 15 min bei 60°C gehalten. Anschließend wurde das Lysat mit Phenol versetzt und die DNS extrahiert (vgl. Material und Methoden Abschnitt 9.). Die DNS wurde über einen CsCl + Eth. Br. Gradienten konzentriert, gegen 5 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8 dialysiert, über Dowex gegeben, um das Eth. Br. zu entfernen (vgl. Material und Methoden Abschnitt 15), und nach einer Äthanol-Fällung und Aufnahme im selben Puffer wurde die optische Dichte bei 260 nm gemessen und die Lösung bei -20°C aufbewahrt. In diesem Zustand ist die DNS für mehrere Monate stabil.

13. Dichtezentrifugation zur Isolierung der Mikroorganismen DNS:

13.1. CsCl Dichtegradienten:

Bei Verwendung von CsCl für die Dichtezentrifugation wurde die mittlere Dichte der Gradienten für die totDNS der Hefen auf 1,699 g / ccm eingestellt. Als Puffer diente der Lysis-Puffer für Mitochondrien pH 7,9.

13.2. CsCl + Eth. Br. Dichtegradienten:

Für Hefe totDNS wurde eine mittlere Dichte von 1,59 g / ccm verwendet. Eth. Br. war in einer Endkonzentration von 200 µg / ml vorher zugegeben worden.

13.3. NaJ-Dichtegradienten:

Rekristallisiertes NaJ wurde in eine gesättigte Lösung

überführt und die Oxidation des Salzes in Lösung durch Zugabe von 0,1 mM DTT unterbunden. Der pH der gesättigten Lösung wurde immer vor Verwendung überprüft, er betrug pH 8. Eth. Br. wurde zu einer Endkonzentration von 1 μ g / ml nach Einstellung des Refraktometer Indexes von 1,4295 (25°C) zugegeben.

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation aller hier beschriebener Gradienten bei 21°C; 33 000 Upm für 63 Std in einer Beckman Ultrazentrifuge Modell L 5-50. Die verwendeten Rotoren waren: Ti 50; Ti 60 und SW 50.1.

14. Sedimentations-Gradienten:

14.1. 5 ml Sucrose-Gradienten 5% - 20%:

Das Mischen der Lösungen Sucrose Ia und Sucrose Ib (vgl. Material und Methoden Abschnitte 3.8. und 3.9.) wurde folgenderweise durchgeführt:

	Ia	Ib
1	0,0 ml	1,0 ml
2	0,2 ml	0,8 ml
3	0,4 ml	0,6 ml
4	0,6 ml	0,4 ml
5	0,8 ml	0,2 ml

Die Lösungen wurden in der oben aufgestellten Reihenfolge durch eine Kanüle, die bis zum Boden des Röhrchens reichte, gegeben und die gebildeten Gradienten über Nacht bei 4°C gehalten.

14.2. 32 ml Sucrose-Gradienten 5% - 25%:

16,5 ml der Sucrose Lösung IIa wurden in den vorderen Teil

eines Gradienten-Mischers eingefüllt, 15,5 ml der Sucrose-Lösung IIB (vgl. Material und Methoden Abschnitte 3.10. und 3.11.) in den hinteren Teil des Mischers. Die Mischung erfolgte durch einen Magnetrührer. Die Auslaufgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß der Gradient nach 30 min fertig war. Kurz vor der Verwendung wurde 1 ml Lysis-Mix (vgl. Material und Methoden Abschnitt 3.18.) übergeschichtet und die zu untersuchenden Protoplasten dazugegeben. Die Zentrifugation erfolgte bei 17 000 Upm für 16 Std in einem SW 27 Rotor.

15. Entfernung von Eth. Br. oder DAPI aus der DNS:

DAPI wurde aus der DNS durch Unterschichten der Lösung mit Isoamylalkohol und Schütteln entfernt. Dazu wurden 3 - 5 Wiederholungen des Vorgangs benötigt.

Eth. Br. wurde unter Verwendung einer Dowex-Säule aus der DNS entfernt. Das Harz (50 WX Porengröße 50 - 100) wurde mit 2N HCl gewaschen, filtriert, zur Na-Form mit 1N NaOH überführt und mit H₂O-dest gewaschen bis ein pH von 11 erreicht war. Anschließend wurde das Harz solange mit 50 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM NaCl gewaschen, bis die Suspension den pH des Puffers erreichte.

16. Behandlung von radioaktivmarkierter DNS aus den Gradienten:

Nach Beendigung der Zentrifugation (Dichtegradienten wurden unter Betätigung der Bremse gestoppt, Sedimentations-Gradienten dagegen nicht) wurden die Gradienten mit Hilfe einer Nadel ausgetropft. Die Fraktionen wurden anschließend mit 1N NaOH versetzt und für 60 min bei 60°C gehalten. Dabei

tritt eine Hydrolyse der RNS ein. Nach Abkühlen der Proben wurde TCA (20%) und 0,1% BSA zugegeben und die Fraktionen filtriert, mit 5% TCA + 0,1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und Äthanol gewaschen und 30 min bei 60°C getrocknet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von 5 ml Scintillations-Mix in einem Isocap-Scintillationszähler.

17. Agarose-Gel-Elektrophorese:

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese der DNS wurde das Puffer-System von Tanaka und Weisblum (1972) verwendet. Die Agarose (Seakem) wurde in H_2O -dest gegeben und unter Rühren zum Kochen gebracht, nach etwa 30 min die Lösung abgekühlt (55°C) und Elektrophorese-Puffer pH 8,3 zugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurde Eth. Br. (1 μg / ml) zu der Agarose zugegeben. Es fanden sowohl Röhrchen-Gele (0,7 cm Durchmesser) wie auch Platten-Gele Verwendung. Die Elektrophoresezeit ist bei den Versuchen angegeben.

18. Isolierung von DNS aus dem Gel:

Nach Herausschneiden der DNS-Bande aus dem Gel wurde das Agarose-Stückchen in Parafilm verpackt und bei -20°C für 3 Std gehalten, anschließend zwischen zwei vorgekühlte Metallplatten gelegt und zusammengequetscht. Nach Abtauen wurde die Flüssigkeit in ein Eppendorf-Gefäß (1 ml) eingefüllt und bei Zimmertemperatur zentrifugiert (2 min; 12 000 Upm). Im Überstand befindet sich die DNS. Unter UV-Licht konnte gesichert werden, daß etwa 80% der Fluoreszenz im Überstand war (Thuring et al. (1975)).

Eine andere Möglichkeit ist das Lösen des Agarosestückchens

in NaJ (Blin et al. (1975)). Nach Einstellung der Dichte wurde die Lösung zentrifugiert (vgl. Material und Methoden Abschnitt 13.3.) und die DNS aus dem Gradienten abpipettiert.

19. Übertragung der DNS-Bande auf Cellulose-nitrat-Filter:

Nach Herausschneiden der DNS-Bande aus dem Gel wurde das Agarosescheibchen mit 0,5N NaOH (15 min) versetzt, anschließend mit Neutralisations-Mix (vgl. Material und Methoden Abschnitt 3.17.) behandelt. Das Scheibchen wurde auf ein Filterpapier, das mit SSC (20-fache Konzentration) getränkt war, gelegt, darüber ein Cellulosenitrat-Filter gegeben und zusätzlich ein Filterpapier, das mit SSC in 2-facher Konzentration befeuchtet war, darauf gelegt. Die Übertragungsdauer betrug 18 Std (Southern (1975)).

20. mit-c-RNS Synthese:

mitDNS gewonnen über ein NaJ-Dichtegradienten wurde dem c-RNS Synthese-Mix dazugegeben. Die Enzymreaktion dauerte 45 min. Anschließend konnte die mit-c-RNS nach DNase Behandlung und Phenol-Extraktion über eine Sephadex G 25 Säule gewonnen werden.

21. Hybridisierung mit mit-c-RNS:

Die Hybridisierung der auf Cellulosenitrat-Filter übertragenen mitDNS erfolgte unter Zugabe von mit-c-RNS, SSC in 6-fachen Konzentration und 50% Formamid für 18 Std bei 60°C (Bishop (1972)).

22. Berechnung des Molekulargewichts der DNS in Sucrose-Sedimentations-Gradienten:

Hierfür wurde die von Freifelder (1970) aufgestellte Formel benützt:

$$D_2 / D_1 = (M_2 / M_1)^{0,38}$$

D = Zurückgelegter Weg der DNS

M = Molekulargewicht der DNS

1 = Standard DNS

2 = DNS, deren Molekulargewicht gesucht wird.

23. Abkürzungen:

rho⁺ : Atmungskompetente Hefezellen mit Wildtyp mitochondrialer DNS

rho⁻ : Atmungsdefekte Hefezellen mit unterschiedlichem Anteil an Wildtyp mitochondrialer Erbinformation.

rho⁰ : Atmungsdefekte Hefezellen ohne jegliche mitochondriale DNS.

mitDNS : mitochondriale DNS

nucDNS : nucleare (Kern) DNS

totDNS : gesamte Hefe DNS

2 µDNS : zwei mikron DNS

mit-c-RNS : In vitro synthetisierte RNS mit mitDNS als Matrice

E coRI : Restriktionsendonuclease vom Bakterium Escherichia coli.

DTT : Dithiothexitol

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethan

EDTA : Äthylendiamintetraessigsäure

SDS : Na-dodecylsulfat

Eth. Br. : Ethidium Bromid

DAPI : Diaminopyrimidinindol

ERGEBNISSE

Allen Versuchen zur Isolierung von mitDNS geht das Aufschließen der Zellen voraus, das sich bei Saccharomyces cerevisiae wegen der Stabilität der Zellwand als schwierig erweist. Sowohl enzymatische (Kováč et al. (1972)) wie mechanische (Lang; Burger; Doxiadis; Thomas; Bandlow und Kaudewitz (1977)) Methoden wurden studiert. Zur Trennung der mitDNS von den anderen DNS-Arten der Hefezellen wurden bekannte Methoden angewandt. Dichtezentrifugationen oder Sedimentationszentrifugationen in Sucrose fanden Anwendung. Schließlich wurde, wegen der relativ einfachen experimentellen Durchführung, ein völlig neuer Weg der Isolation und der Trennung begangen. Bei Plasmiden des Bakteriums Escherichia coli ist eine Trennung von DNS-Molekülen durch ihre Mobilität in Agarose-Gelen beschrieben (Takahashi et al. (1969)). Die Brauchbarkeit dieser Methode in der Molekular Biologie der Hefe sollte untersucht werden. Bevor eine Charakterisierung der für die Isolierung optimalen Aufschlußmethoden gegeben wird (Abschnitt 1.3.), sollen zunächst diejenigen Parameter vorgestellt werden, die zur Bewertung des Präparationserfolges herangezogen werden. Es sind dies:

- a) Trennung von nucDNS und mitDNS in CsCl-Dichtegradienten,
- und b) Sedimentation und damit Reindarstellung von mitDNS in Sucrose-Gradienten.

1.1. Dichte-Gradienten-Zentrifugation:

Für die Trennung von DNS-Molekülen verschiedener Dichte eignet sich CsCl. Das Salz hat eine hohe Dichte und die Eigenschaft, im Schwerfeld einen Dichtegradienten zu bilden. Mitlaufende

Substanzen wie z.B. DNS konzentrieren sich in der Bande ihrer spezifischen Dichte.

Um mitDNS von der nucDNS zu trennen und darzustellen, wurde homogen markierte ^3H totDNS mit CsCl zu einer Enddichte von 1,699 g / ccm gemischt und zentrifugiert. Nach Fraktionierung des Gradienten und anschließender Hydrolysierung der RNS wurde die Radioaktivität in den Proben bestimmt (vgl. Material und Methoden Abschnitte 13.1 und 16.). Die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten ist in Abb. 4 (durchgezogene Linie) dargestellt. Die unterbrochene Linie zeigt den Verlauf des Gradienten. Im Bereich von 1,695 g / ccm tritt ein Maximum auf. Dieses hat zum weniger dichten Bereich hin eine Schulter (1,683 g / ccm). Das erste Maximum stellt die nucDNS, die Schulter die mitDNS dar (Wintersberger et al. (1974)). Die Trennung der beiden DNS-Arten (nuc und mit) gelingt somit auf diesem Wege nicht in ausreichendem Maße, um quantitative Bestimmungen des Anteils der mitDNS an der totDNS durchzuführen.

Um eine bessere Trennung der verschiedenen DNS-Arten zu erreichen, bietet sich die Verwendung von Substanzen wie z.B. Eth. Br. an. Dieser Farbstoff eignet sich für den Zweck besonders, da er i) durch Interkalation in doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle ihre Dichte herabsetzt und dabei ii) bevorzugt in A + T reiche Regionen, die in der mitDNS auftreten (Frunell und Bernardi (1977)), interkaliert, sowie iii) unter UV-Licht einen fluoreszierenden Komplex mit der DNS bildet. Dies erleichtert die Erkennung der Banden im Gradienten. Die oben dargestellte Gradientenzentrifugierung wurde wiederholt,

dabei jedoch dem Gradienten Eth. Br. zugegeben. Abb. 5 zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten; Abb. 6 stellt ein Scanogram der Photographie eines Gradienten dar. Zwei deutlich voneinander getrennte Maxima treten auf. Das Hauptmaximum enthält etwa 90 % der Gesamt-Radioaktivität, das Neben-Maximum etwa 10 %. Das erste Maximum stellt die nucDNS, das andere die mitDNS dar (Grossman et al. (1969); Christiansen et al. (1974)). Auf dem Scanogram ist dasselbe zu sehen, mit dem Unterschied, daß die Trennung der verschiedenen DNS-Arten deutlicher erkennbar wird. Dieser Unterschied wird durch eine Verschmierung der hochmolekularen nucDNS bei der Fraktionierung des mit radioaktiver DNS beladenen Gradienten verursacht. CsCl / Eth. Br. Gradienten sind also für die Darstellung der mitDNS neben der nucDNS geeignet.

1.2. Molekulargewichtsbestimmung der mitDNS:

Das Molekulargewicht der mitDNS wurde von Hollenberg et al. (1970) mit Hilfe der Elektronen-Mikroskopie mit 50 Megadalton errechnet. Blamire et al. (1972) bestätigten dieses Ergebnis durch Sedimentation der mitDNS im Sucrose-Gradienten, Sanders et al. (1976), Rabinowitz et al. (1976) und Prunell et al. (1977) fanden dasselbe Molekulargewicht nach Analyse der Restriktionsendonuclease-Fragmente der mitDNS. Im Gegensatz dazu verteilt sich das Molekulargewicht der Chromosomen zwischen 200 - 900 Megadalton (Blamire et al. (1972); eigene Beobachtung vgl. Abb. 7).

Eine Sedimentation der mitDNS im Sucrose-Gradienten soll hier dargestellt werden, um 1) die oben angegebenen Ergebnisse zu

überprüfen und ii) sie als Test-System für die später in dieser Arbeit durchgeführten Präparationsmethoden zur Isolierung von mitDNS verwenden zu können. Mit ^3H Adenin homogen markierte Zellen des Stammes A 364 A wurden, wie unter Abb. 8 beschrieben, behandelt. Die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten ist in dieser Abb. dargestellt. Das Maximum der Referenz ist als Pfeil angegeben. Drei Maxima der ^3H Impulse sind zu erkennen. Die Berechnung der Molekulargewichte (vgl. Material und Methoden Abschnitt 20.) ergab, daß diese Maxima annähernd den Molekulargewichten 100; 50; 20 Megadalton entsprechen. Etwa 70 % der Gesamt-Radioaktivität befand sich im 50 Megadalton-, 5 % im 100-Megadalton- und 25 % im 20-Megadalton-Pereich. Da in diesem Experiment der Nachweis, daß es sich in den drei Maxima ausschließlich um mitDNS handelt, nicht erbracht wurde, musste wie nachstehend beschrieben die Dichte der Moleküle ermittelt werden.

1.2.1. Dichte der DNS aus Sucrose-Gradienten:

DNS der Fraktionen 10 - 16; 17 - 23 und 24 - 28 (vgl. Abb. 8) wurden gesammelt, mit ^{14}C totDNS gemischt, anschließend mit CsCl / Eth. Br. versetzt und zentrifugiert. In der Abb. 9 A; 9 B und 9 C ist jeweils das Ergebnis der Gradienten mit den Fraktionen 10 - 16; 17 - 23 und 24 - 28 dargestellt. In allen drei Fällen fällt das ^3H Maximum mit dem ^{14}C Maximum der mitDNS zusammen. Daraus folgt, daß alle drei Maxima im Sucrose-Gradienten ausschließlich mitDNS enthielten.

Aus beiden Versuchsreihen 1.2. und 1.2.1. ist ersichtlich, daß das Molekulargewicht der mitDNS etwa 50 Megadalton ent-

spricht, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (Hollenberg et al. (1970); Blamire et al. (1972); Sanders et al. (1976); Prunell und Bernardi (1977)) steht. Die etwa 100 Megadalton-Fraktion ist, wie später gezeigt wird, kein Versuchsartefakt. Sie könnte eine replikationsintermediäre Struktur der mitDNS darstellen. Der prozentuale Anteil der 20 Megadalton-Fraktion schwankt von Experiment zu Experiment. Dieses unterstützt die Annahme, daß diese Molekül-Gruppe aus versuchsbedingten Scherprodukten der mitDNS besteht.

1.3. Zellaufschluß:

1.3.1. Mechanische Methoden zur Gewinnung von mitDNS:

Die Isolierung von intakten Mitochondrien aus Hefezellen, um daraus mitDNS zu gewinnen, wird im folgenden angestrebt. Dadurch kann eine Kontamination mit nucDNS vermieden werden. Maschinelle Verfahren zum Aufbrechen der Zellwand ("Braunhomogenisator"; Dynomil; Stickstoff-Pressen) hatten, wegen der dabei auftretenden starken Scherkräfte, geringe Ausbeuten an Mitochondrien zur Folge. Daher sind diese Verfahren nur zur Isolierung des Gemisches von mit und nucDNS durch Phenol-Extraktion des Zellsats zu verwenden und wurden deswegen hier nicht weiter verfolgt (Ergebnisse hier nicht gezeigt, vgl. aber Lang; Burger; Doxiadis; Thomas; Bandlow und Kaudewitz (1977)). Manuelles Schütteln eines Gemischs von Zellsuspension und Glasperlen ist für die Isolierung intakter Mitochondrien aus ganzen Zellen dem maschinellen überlegen (vgl. Lang et al. (1977)). Erfahrungen mit dieser Methode sind im folgenden wiedergegeben. Dafür wurden Zellen des haploiden Stammes

A 364 A in der spätlogarithmischen Phase abzentrifugiert und in zwei Aliquote geteilt, das erste wurde zu einer Konzentration von 200 mg Zellnaßgewicht / ml Knack-Puffer aufgenommen und zusammen mit Glasperlen in eine 1 l Merck-Flasche gegeben und (vgl. Material und Methoden Abschnitt 10.2.) bis zum Aufschluß von etwa 65 % - 80 % der Zellen geschüttelt. Zum Vergleich wurde das zweite Aliquot enzymatisch behandelt. Die Mitochondrien beider Präparations-Methoden wurden durch fraktionierte Zentrifugation gewonnen und über Urografin-Dichtegradienten gereinigt (vgl. Material und Methoden Abschnitte 11. und 9.). Für die Berechnung der erzielten Ausbeuten wurde die Protein-Menge der isolierten und gereinigten Mitochondrien-Fraktion bestimmt. Die Protein-Bestimmung wurde anderen Bestimmungsarten vorgezogen, weil sie eine schnelle, genaue und wenig aufwendige Methode darstellt. Das Ergebnis ist in Tab. 2 angegeben. Die höchste Ausbeute wurde dabei mit der enzymatischen Methode erzielt (3,5 mg mitProtein / g Zellnaßgewicht). Mit der manuell mechanischen Methode konnten 3,0 mg mitProtein gewonnen werden.

Ergebnisse aus Experimenten, die mit der manuell-mechanischen Methode durchgeführt wurden, werden in den Abschnitten 1.3.3.; 3.3.; und 3.5., die mit der enzymatischen Methode in den Abschnitten 1.3.3.; 2.1.1.; 2.1.2.; 2.2.; 2.3.; 3.1.; 3.2.; 3.5.; und 3.6. diskutiert. Der enzymatische Aufschluß kann an Zellen vorgenommen werden, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Zellen in der stationären Phase müssen, da ihre Zellwände gegen "Helicase" weitgehend resistent sind,

manuell-mechanisch aufgebrochen werden.

1.3.3. Vergleich beider Methoden:

Zur Untersuchung der Verteilung des Molekulargewichts der mit DNS aus beiden Mitochondrien-Präparationen wurden Zellen des Stammes A 364 A in Glycerin-Minimal-Medium gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur in zwei Aliquote geteilt. Das erste wurde mit ^3H -Adenin versetzt und die Mitochondrien nach der manuell-mechanischen-Methode isoliert, das zweite mit ^{14}C -Adenin markiert und die Organellen durch enzymatische Spaltung der Zellwand freigesetzt. Die Mitochondrien wurden gemischt und gemeinsam über einen Urografin-Gradienten gereinigt. Die so isolierten Organellen wurden auf einem linearen Sucrose-Gradienten (vgl. Blamire et al. (1972)) lysiert und zentrifugiert. Abb. 10 zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten. Wie schon im Abschnitt 1.2.1. gezeigt wurde, handelt es sich bei den auftretenden Maxima um mitDNS. Die Verteilung der Radioaktivität in Abb. 10 ist für beide Markierungsarten gleich, also ist das Molekulargewicht der mitDNS aus Mitochondrien, isoliert nach verschiedenen Methoden, ähnlich gut. Daraus folgt, daß beide Methoden für die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen geeignet sind.

2. Vergleich verschiedener Methoden zur Trennung von nuc und mitDNS:

2.1. Dichtezentrifugation:

Die im vorstehenden Kapitel beschriebenen Versuche benutzen zur Anreicherung von mitDNS Methoden der Isolierung von Mito-

chondrien aus ganzen Zellen. Nachstehend sollen Verfahren untersucht werden, mit deren Hilfe eine Trennung beider DNS-Arten der Hefezellen ohne vorherige Isolierung der Mitochondrien erzielt werden kann.

Wie in Abb. 5 und 6 gezeigt, ist bei CsCl / Eth. Br. Gradientenzentrifugierung die Trennung der DNS-Arten (nuc und mit) nicht vollständig. Quantitative Aussagen über den mitDNS-Gehalt können nicht erzielt werden, es sei denn, daß 3, wie in der Literatur beschrieben (Rabinowitz et al. (1976)); eigene Vorversuche), aufeinander folgende Dichtezentrifugationen durchgeführt werden. Dies führt zu einer drastischen Molekulargewichtsverminderung der mitDNS und erfordert einen enormen zeitlichen Aufwand (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Bei Zugabe größerer Mengen von Eth. Br. zu den Gradienten tritt eine zusätzliche Trennung von linearen und Ring-Molekülen auf, ohne daß eine optisch erkennbare Trennung von mit und nucDNS erfolgt. Bei sehr vorsichtiger Bearbeitung der Protoplasten können dann 4 verschiedene Banden erkannt werden (vgl. Photo Nr. 2).

2.1.1. Dichtezentrifugation mit CsCl / DAPI:

Diaminopyrimidinindol (DAPI) hat, wie Eth. Br., die Eigenschaft in A + T reiche Regionen der DNS zu interkalieren (Dann pers. Mitteilung) und fluoresziert unter UV-Licht im Gelbbereich. Williamson und Fenell (1975) nutzten diese Eigenschaft, um eine bessere Trennung von mit und nucDNS erreichen zu können. Da nur aus diesem Labor Erkenntnisse über die Wirkung von DAPI

berichtet wurden, wird im Folgenden über Versuche berichtet, die Frage zu klären, ob CsCl / DAPI eine bessere Trennung von mit und nucDNS bewirken kann als CsCl / Eth. Br.. Dafür wurde homogen markierte ^3H totDNS des Stammes DT 6 sowie unmarkierte DNS mit CsCl gemischt, DAPI zu einer Endkonzentration von $100\text{ }\mu\text{g / ml}$ zugegeben und der Gradient zentrifugiert. In Abb 11 ist die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten dargestellt; Photo Nr. 3 zeigt den Gradienten. Die Trennung beider DNS-Arten ist sowohl auf dem Photo wie auch in der Abb. 11 optimal. Diese Methode wäre daher für präparative Zwecke zur Isolierung von mitDNS am geeignetesten, wenn es gelänge, nach der Zentrifugation das DAPI aus der DNS zu entfernen.

2.1.1.1. Entfernung von DAPI aus der DNS:

Aus einem mit radioaktiv markierter DNS beladenen Gradienten wurde die obere Bande (vgl. Photo Nr. 3), welche die mitDNS darstellt, abpipettiert und mit dem gleichen Volumen an Isoamylalkohol gemischt. Dabei löst sich das Agens aus der DNS und tritt in die Alkohol-Phase über. Es bedurfte 5-maliger Wiederholung des Vorgangs, um das DAPI vollständig aus der DNS zu entfernen. Anschließend wurde eine Molekulargewichtsbestimmung der so behandelten DNS im Sucrose-Gradienten (vgl. Matariel und Methoden Abschnitt 14.1.) durchgeführt. Als Marker diente ^{14}C col E1 DNS (Molekulargewicht = 4 Megadalton). In Abb. 12 ist die Verteilung der Radioaktivität im Sucrose-Gradienten dargestellt. Das errechnete Molekulargewicht der DNS in dem erkennbaren Maximum betrug 3,4 Megadalton. Das stellt $1 / 16$ des tatsächlichen Molekulargewichts der mitDNS dar.

Aus diesem Ergebnis folgt, daß die von Williamson und Fenell (1975) angewandte Methode zwar eine bessere Trennung von mit und nucDNS bewirken kann, sie führt aber zur Molekulargewichtsverminderung der mitDNS. Sofern also eine quantitative Aussage über den Gehalt von mitDNS in den Zellen getroffen werden soll, ist diese Methode geeignet. Anderenfalls, wenn das Molekulargewicht der DNS weitgehend dem ursprünglichen gleichen soll, ist diese Methode nicht geeignet.

Im Abschnitt 3.2. sind Ergebnisse, die mit der oben angegebenen Methode erzielt wurden, beschrieben und diskutiert.

2.1.2. Dichtezentrifugation mit NaJ:

Für alle im Vorstehenden beschriebenen Dichtezentrifugationen wurde CsCl als Träger-Salz verwendet. Diese Verfahren führten zu unvollständiger Trennung von mit und nucDNS, oder erforderten zusätzlich Agenzien, mit deren Hilfe zwar eine bessere Trennung erzielt wurde, deren Entfernung aber Brüche der DNS zur Folge hatte.

Von einem anderen Träger-Salz (NaJ) ist aus der molekularen Biologie der Bakterien bekannt, daß es sich als Zusatz bei Nukleinsäure-Zentrifugationen gut eignet. Für Hefe-DNS ist bisher diese Technik nur in einem Labor im Gebrauch. De Kloet und Andrean (1971) konnten mit Hilfe von NaJ rDNS (ribosomale DNS) isolieren. Widersprüchliche Ergebnisse über die Verwendung von NaJ ließen die Methode der Dichtezentrifugation zur Trennung von mit und nucDNS als nicht geeignet erscheinen (Williamson pers. Mitteilung). Eigene Vorversuche zeigten, daß der Dichteverlauf im NaJ-Gradienten verglichen mit einem

CsCl-Gradienten weniger steil war. Dieses wurde als Vorteil angesehen, um eine bessere Trennung von mit und nucDNS der Hefe zu erzielen, die wie oben gezeigt, einen relativ geringen Dichte-Unterschied aufweisen. Um das Ausmaß der Trennung beider DNS-Arten zu prüfen, wurde mit ^3H -Adenin homogen markierte tot DNS in NaJ gelöst und nach Zugabe von Eth. Br. der Gradient zentrifugiert. Abb. 13 stellt die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten; Photo Nr. 4 den Gradienten vor der Fraktionierung dar. Zwei Maxima sind zu erkennen. Das erste, mit hoher Dichte, stellt die nucDNS, das zweite die mitDNS dar. Im Vergleich zum CsCl-Gradienten ist die Trennung in NaJ jedoch sehr viel besser, die Maxima sind 6 Fraktionen voneinander getrennt (vgl. Abb. 4; 5; 6; 12 und Photo Nr. 3). Daraus ist zu ersehen, daß diese Methode zur Trennung von mit und nucDNS von allen im Vorstehenden beschriebenen am geeignetesten ist, weil i) auch nach Fraktionierung des Gradienten beide Maxima getrennt bleiben, ii) die Anwendung von Eth. Br. in geringen Konzentrationen die DNS optisch erkennbar macht, das Äther aber leicht entfernt werden kann und iii) das Träger-Salz preiswerter als CsCl ist.

2.2. Sedimentations-Gradienten:

Die Anwendung der Sedimentations-Zentrifugation zur Bestimmung des Molekulargewichts von DNS-Molekülen ist im Abschnitt 1.2. beschrieben. Die Verwendung dieser Methode zur Trennung von mit und nucDNS aus Hefezellen ist bislang nicht durchgeführt worden. Der Versuch dieser Trennung durch Isolierung reiner, nicht mit nucDNS kontaminierter Mitochondrien erwies sich

als erfolgreich, soweit de-reprimierte, also nicht in vergärbarem Substrat gewachsene Zellen verwendet wurden (vgl. Abb. 10). Die Isolierung von Organellen aus in vergärbarem Substrat gewachsenen Zellen brachte relativ geringe Ausbeuten an Mitochondrien (Ergebnisse hier nicht gezeigt). In diesem Medium gewachsene Zellen haben nur ein großes amöboidales Mitochondrion (Stevens (1977)), das äußerst labil ist und bei der Isolierung leicht zu Bruch geht.

Zur Demonstration der Methode wurden homogen mit ^3H -Adenin markierte Zellen des Stammes SM 1211-1R protoplastiert und auf einem linearen Sucrose-Gradienten lysiert. In Abb. 14 ist die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten aufgezeichnet. Drei Maxima sind zu erkennen. Verglichen mit dem in Abb. 8 gezeigten Gradienten (Lysat von isolierten Mitochondrien bei 17 000 Upm zentrifugiert), läßt sich schließen, daß beide Gradienten die gleiche Verteilung aufweisen. Dichtezentrifugationen der DNS der Maxima-Fraktionen zeigten, daß letztere ausschließlich mitDNS enthielten (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Durch die Verwendung eines im untersten Teil des Gradienten befindlichen Sucrose-Kissen, das die Aufgabe hat, die hochmolekulare nucDNS aufzufangen (vgl. Abb. 7), bietet diese Methode einen zusätzlichen Vorteil, nämlich das Bandieren der nucDNS. Damit wird die Berechnung des relativen Anteils von mitDNS an der totDNS der Zellen möglich.

2.3. Gelelektrophoretische Methode zur Isolierung von mitDNS:

Alle bisher beschriebenen Methoden erforderten die Ultrazentrifu-

gation von Gradienten, was sowohl Zeit wie Material aufwendig ist. Publikationen aus der molekularen Biologie der Bakterien wiesen auf eine andere Darstellungs-Methode der DNS hin, die von den bislang gezeigten grundlegend verschieden ist: Plasmide von Escherichia coli werden mit Hilfe der Gelelektrophorese von der chromosomalenDNS getrennt (Collins et al. (1976)): Dabei wird ein Zell-Lysat auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Im elektrischen Spannungsfeld wandern die DNS-Moleküle entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zum positiven Pol hin.

Wie im obigen Abschnitt beschrieben, ist im Lysat von Protoplasten der Hefe die mitDNS im Vergleich zu der nucDNS diejenige mit dem geringeren Molekulargewicht (eine dritte DNS-Art der Hefezellen (2 μ DNS) ist hier vernachlässigbar, weil sie bei den gewählten Versuchsbedingungen im Aufschlußbereich des Gels wandert). Der Molekulargewichtsunterschied wurde als groß genug angesehen, um eine vollständige Trennung der DNS-Arten erwarten zu können. Protoplasten des Hefestammes SM 1211-1B wurden auf Agarose-Gel lysiert und elektrophorisiert. Das Ergebnis ist auf Photo Nr. 5 gezeigt. Drei Banden sind erkennbar (im weiteren mit I, II, III bezeichnet). Da die Färbung des Gels mit Eth. Br. durchgeführt wurde, handelt es sich dabei um DNS oder um RNS mit Doppelstrang-Regionen (z.B. tRNS, rRNS vgl. Photos Nr. 3 und 4.).

2.3.1. Nachweis von DNS im Gel:

Die einfachste Unterscheidung von DNS und RNS ist die Verwendung von NaOH, wobei im Gegensatz zur DNS die RNS hydrolysiert

wird. Der obige Versuch wurde mit homogen markierten Protoplasten (^{32}P) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Mitte längs geschnitten, die eine Hälfte mit NaOH behandelt und die andere bei 4°C in Puffer gehalten. Anschließend wurden beide Gel-Hälften mit Hilfe einer Rasier-Klingen-Vorrichtung in Fraktionen zerschnitten und die Radioaktivität in den Proben bestimmt. In Abb. 15 A ist die Verteilung der Radioaktivität bei der nichtbehandelten Gel-Hälfte; 15 B bei der mit NaOH behandelten Hälfte aufgetragen. Alle auf dem Photo erkennbaren Banden sind in Abb. 15 A als Maxima in der Verteilung zu sehen. Abb. 15 B dagegen zeigt nur zwei Maxima. Daraus folgt, daß diese zwei Banden (I und II) DNS enthalten.

2.3.2. Nachweis von mitDNS im Gel:

Ein Nachweis der Herkunft der DNS in der langsam wandernden, die Masse der DNS enthaltende Bande I wurde durch zwei verschiedene Methoden durchgeführt:

- a) Mittels der Dichtezentrifugation
- b) Mit Hilfe von Hybridisierung der DNS mit mit-c-RNS.

2.3.2.1. Dichtebestimmung:

^{32}P -markierte Protoplasten wurden nach der Lyse auf ein Gel aufgetragen, die langsam wandernde Bande I herausgeschnitten und in NaI gelöst (vgl. Material und Methoden Abschnitt 18.). Anschließend wurde die Lösung mit ^3H totDNS gemischt und der Dichte-Gradient zentrifugiert. In Abb. 16 ist die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten aufgezeichnet. Das ^{32}P -Maxi-

mum (offene Kreise) fällt mit dem ^3H -Maximum der mitDNS zusammen. Daraus ist zu schließen, daß die Bande I im Gel ausschließlich mitDNS darstellt. Es ist bemerkenswert, daß diese Bande keine meßbare Kontamination mit nucDNS aufweist.

2.3.2.2. Hybridisierung der in der Bande enthaltenden DNS mit mit-c-RNS:

Um eine Hybridisierung der in der Bande I vorhandenen DNS mit mit-c-RNS durchzuführen, war es zunächst notwendig, die DNS aus dem Gel zu isolieren. Dafür eignet sich die von Southern (1975) beschriebene Methode am besten.

Nach der Elektrophorese wurde die Bande aus dem Gel herausgeschnitten und die enthaltende DNS mit NaOH denaturiert. Das Gelscheibchen wurde dann auf ein Filterpapier gelegt, das mit Puffer (Standard-Saline-Citrat in 20-fachen Konzentration) getränkt war. Über das Gel wurde der Cellulosenitrat-Filter gegeben und darüber ein anderes Filterpapier, das mit 2-fach konzentriertem Puffer befeuchtet war. Mit Hilfe des Salzgradienten wandert die Einzelstrang DNS vom Gel auf das Cellulosenitrat-Filter, wo sie gebunden wird. Für den Hybridisierungsvorgang vgl. Material und Methoden Abschnitt 21. Die mit-c-RNS wurde in vitro von einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase unter Benützung von mitDNS als Matrize (vgl. Material und Methoden Abschnitt 22.) synthetisiert. Die Hybridisierung ergab für die Kontrolle (d.h. Hybridisierung mit einem Filter ohne DNS) 35 cpm. Für die DNS aus der Bande I 280 cpm. Daraus folgt, daß diese Bande mitDNS enthält.

2.3.3. Molekulargewichtsbestimmung der mitDNS im Gel:

Die obigen Abschnitte beschreiben eine neue Methode zur Isolierung von mitDNS mit Hilfe der Gelelektrophorese. Es konnte gezeigt werden, daß i) die Bande I mitDNS enthielt, ii) diese sehr rein war und iii) Hybridisierung mit RNS direkt aus dem Gel möglich ist. Ziel der folgenden Versuchsreihe ist die Bestimmung des Molekulargewichts dieser DNS. Dafür wurden Agarose-Gele mit verschiedenen Konzentrationen (0,2% - 1,5%) verwendet, die gleichzeitig mit Hefeprotoplasten, λ -DNS, P 22-DNS und T₄-DNS beladen wurden. Nach der Elektrophorese wurden die Abstände der jeweiligen Banden vom Anfang des Gels gemessen und halblogarithmisch aufgetragen (vgl. Abb. 17). Die mitDNS-Bande liegt immer, d.h. bei jeder angewendeten Agarose-Konzentration, zwischen λ -DNS und T₄-DNS. Die Molekulargewichte der beiden Phagen-DNS-Spezies betrugen: λ -DNS = 30 Megadalton und T₄-DNS = 130 Megadalton. Daraus folgt, daß das Molekulargewicht der mitDNS größer als 30 und kleiner als 130 Megadalton sein muß. Auf Grund der nicht optimalen Auflösung der Agarose-Gele kann das Molekulargewicht jedoch nicht exakt ermittelt werden. Aus Abb. 18 kann aber das Molekulargewicht der mitDNS mit etwa 50 Megadalton geschätzt werden, was den schon gezeigten Ergebnisse vergleichbar ist (vgl. Abb. 8).

2.4. Zusammenfassung:

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

1. Für die Trennung von mit und nucDNS der Bäckerhefe eignen sich Dichtegradienten-Zentrifugationen in NaJ und CsCl / DAPI. Letztere sind für präparative Arbeiten nur dann zu verwenden, wenn eine Verringerung des Molekulargewichts der zu isolierenden mitDNS in Kauf genommen werden kann.
2. Molekulargewichtsbestimmung und Reindarstellung der mit DNS können mit Erfolg im Sucrose-Sedimentations-Gradienten durchgeführt werden. Diese sind mit Hefe-Protoplasten zu beladen und mit einer für die mitDNS geeigneten Geschwindigkeit (17 000 Upm für das hier verwendete System) zu zentrifugieren.
3. Die im Vorstehenden beschriebene, neu entwickelte Agarose-Gel-Methode ist den obigen an Einfachheit der Durchführung und relativ geringem Zeit und Material-Aufwand sowie an Reinheit der gewonnenen mitDNS erheblich überlegen.

3. Untersuchung der mitDNS von Mutanten:

Vier konditionelle Mutanten (tsm-8; tsp-20; tsp-25 und tsp-30) standen zur Verfügung, die eine Instabilität der mitDNS zeigen: Wachstum der Zellen bei 35°C bewirkt, daß die Rate der Bildung von rho⁻ Zellen stark ansteigt, sodaß innerhalb von 5 - 12 Zellgenerationen ihr Anteil in der Gesamtpopulation nahezu 100% erreicht (vgl. Abb. 18). Mit der rho⁻ Bildung geht ein starker Verlust genetischen Materials des mitochondrialen Genoms und der Proteinsynthese einher (Backhaus et al. (1978); Bandlow et al. (1977)). Dieser Informationsverlust sowie das Erliegen der mitochondrialen Proteinsynthese der konditionellen Mutanten bei nicht permissiver Temperatur kann folgenderweise erklärt werden: durch

- 1) Punktmutationen in der Regionen der mitDNS, die für die Proteinsynthese-Komponenten kodieren. Dadurch ist aber eine hohe Mutabilitätsrate dieser DNS-Sequenzen erforderlich.
- 2) Stückverluste von DNS-Sequenzen mit kodierendem Charakter. Diese können entweder Änderungen der Mononukleotid-Sequenz (Rasterschub) oder Deletionen von Genomabschnitten sein.
- 3) Störung der Replikation der mitDNS.

Folgende Kriterien wurden angewandt, um zu klären, welche der oben aufgestellten Hypothesen zutrifft:

- 1) Replikationsfähigkeit der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur.
- 2) Molekulargewichtsbestimmung der mitDNS nach Behandlung der Zellen bei nicht permissiver Temperatur.
- 3) Dichtevergleiche zwischen mitDNS nach der oben angegebenen

Behandlung und ρ^+ mitDNS.

- 4) Restriktionsanalyse der mitDNS.
- 5) Längen-Bestimmung des zurückbehaltenen Genomteils, der bei nicht permissiver Temperatur gebildeten ρ^- Mutanten.

3.1. Untersuchungen an der Mutante tsm-8:

Die extrem gesteigerte Häufigkeit der ρ^- Bildung der tsm-8 Mutante ist durch eine Mutation der mitDNS bedingt. Zur Klärung der Replikationsfähigkeit der mitDNS dieser Mutante wurden Zellen des diploiden Stammes SM 551 (tsm-8) homogen mit ^{14}C -Adenin markiert. Anschließend wurde die Kultur in Glucose-Minimal-Medium aufgenommen, in zwei Aliquote geteilt und i) bei 23°C oder ii) 35°C bebrütet. Der Versuchsablauf ist in Abb. 19 dargestellt. Zum Zeitpunkt 15 min, nach Aufnahme der Kulturen in frische Medien, wurde von den zwei Aliquoten Zellen entnommen und 180 min lang mit ^3H -Adenin markiert. Anschließend wurden die Zellen protoplastiert und die Protoplasten pelletiert. Dasselbe wurde mit Zellen aus der Kultur ii) zu den folgenden Zeiten durchgeführt: 120 min; 240 min; 360 min und 480 min. Beiden Aliquoten wurde nach 1140 min Zellen entnommen und der gleiche Vorgang wiederholt. Diese so gewonnenen Protoplasten wurden dann jeweils auf einen Sucrose-Gradienten geschichtet und zentrifugiert. Die offenen Kreise in Abb. 20 A 1,2 und 20 B 1 - 6 stellen die Verteilung der Radioaktivität für die Vormarkierung (^{14}C), die geschlossenen dagegen, die für die Nachmarkierung (^3H) dar. In allen Gradienten sind sowohl für die Vormarkierung wie auch für die Markierung bei nicht permissiver Temperatur 3 Maxima vorhanden. Sie

stellen mitDNS dar, wie ein Vergleich mit der Abb. 8 erkennen läßt. Daraus folgt, daß die mitDNS dieser Mutante bei nicht permissiver Temperatur repliziert wird. Die ρ^- Bildung bei erhöhter Temperatur ist daher nicht durch einen Replikationsstop der mitDNS zu erklären.

Zur Erhärtung des Befundes wurde der gleiche Versuch mit dem haploiden Stamm SM 1211-1B, der die gleiche Mutation tsm-8 trägt, wiederholt. Das Ergebnis (hier nicht gezeigt) war dem oben besprochenen gleich, sodaß ausgeschlossen werden konnte, daß die Replikation der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur eine Stammspezifität der diploiden Zellen ist.

3.2. Dichtezentrifugation der mitDNS aus der Mutante tsm-8:

Im obigen Abschnitt ist gezeigt worden, daß die erhöhte Häufigkeit der ρ^- Bildung der Mutante tsm-8 nicht auf einem Replikationsstop der mitDNS beruhen kann. Auch eine längere Behandlung der Zellen bei nicht permissiver Temperatur erbrachte keine Verringerung der in die mitDNS eingebauten Markierung, wie auch kein Verlust an Molekulargewicht dieser DNS. Der Nachweis beruhte auf Sedimentation der mitDNS im Sucrose-Gradienten.

Im folgenden wurde die Dichte der bei nicht permissiver Temperatur neu synthetisierten mitDNS mit der vor Erhöhung der Temperatur in den Mitochondrien vorhandenen verglichen. Dies sollte darüber Aufschluß geben, ob der A + T bzw G + C Gehalt der Vorlage (vor der Erhöhung synthetisiert) gleich der Kopie (bei nicht permissiver Temperatur synthetisiert) ist. Eine unterschiedliche Dichte der beiden DNS-Moleküle

würde bedeuten, daß die Replikation stark fehlerhaft war, was den für die ρ^- Bildung der Zellen bezeichnenden Informationsverlust erklären könnte. Dafür wurden Zellen des Stammes SM 1211-1B homogen mit ^{14}C -Adenin markiert. Die Kultur wurde ähnlich dem obigen Experiment in zwei Aliquote geteilt, die bei verschiedenen Temperaturen (23°C und 35°C) belüftet wurden. Nach der Markierung mit ^3H -Adenin wurden die Zellen protoplastiert, die Lysate mit CsCl / DAPI gemischt und zentrifugiert. Zur Demonstration der unterschiedlichen Dichte von ρ^- mitDNS wurden Protoplasten (^3H) einer ρ^- Mutante (BM 1421-1C) mit homogen markierten Protoplasten (^{14}C) der oben verwendeten Kultur gemischt, lysiert, CsCl / DAPI zugegeben und zentrifugiert.

In Abb. 21 A 1,2; 21 B 1 - 6 und 21 C ist die Verteilung der Radioaktivität aufgetragen. Die offenen Kreise stellen die Vormarkierung (^{14}C), die geschlossenen dagegen die Nachmarkierung bzw die Markierung der ρ^- Mutanten DNS (^3H) dar. Das Maximum der neusynthetisierten mitDNS fällt in allen Fällen mit dem Maximum der vor Erhöhung der Temperatur synthetisierten DNS zusammen. Die einzige Ausnahme stellt die mitDNS der ρ^- Mutante dar (Abb. 21 C). Ihr Maximum ist um 2 Fraktionen zum dichteren Bereich hin verschoben. Die mitDNS dieser Mutante hat also einen veränderten G + C Gehalt verglichen mit dem der ρ^+ mitDNS. Aus dieser Versuchreihe kann geschlossen werden, daß bei der Replikation der mitDNS der konditionellen Mutante tsm-8 bei nicht permissiver Temperatur keine gravierenden Fehler bezüglich des G + C

bzw A + T Gehalts gemacht werden, anderenfalls würden solche Fehler zu einer Verschiebung des Maximums der neusynthetisierten mitDNS führen. Änderungen des G + C Gehalts von 1 - 2% können mit der obigen Versuchsreihe nicht erkannt werden, weil die Auflösung der benützten Methode in diesem Bereich nicht ausreicht.

3.3. Restriktionsanalyse der mitDNS aus Mutante tsm-8:

Unter Zuhilfenahme der Restriktions-Endonuclease E coRI soll im folgenden untersucht werden, ob bei der Replikation der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur Fehler gemacht werden, die zu einer Änderung des G + C Gehalts bis 2% und zur ρ^- Bildung der Zellen führen. Diese Endonuclease spaltet die mitDNS von ρ^+ Stämmen in 9 Fragmente (Sanders et al. (1975)). Im Falle fehlerhafter Replikation sollte sich die Anzahl der Fehler akkumulieren. Davon wären die Erkennungsstellen des Enzyms auf der DNS betroffen, sodaß die resultierenden Fragmente sich von den ursprünglichen unterscheiden sollten. Nach Spaltung von mitDNS aus ρ^- Mutanten konnte festgestellt werden, daß sowohl ρ^+ mitDNS Fragmente fehlten wie auch neue auftraten (Sanders et al. (1975)).

Um zu prüfen, ob die Replikation fehlerhaft war, wurden Zellen des Stammes SM 1211-1R in YPDG-Medium gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur bei nicht permissiver Temperatur belüftet. Bei Versuchsbeginn und zu den folgenden Zeiten: 3 Std; 6 Std; 18 Std und 24 Std wurden Aliquote aus der Kultur entnommen, die mitDNS isoliert und mit der Restriktions-Endonuclease behandelt. Die durch die Enzym-Wirkung entstandenen Fragmente

wurden elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe von Eth. Br. sichtbar gemacht und photographiert (vgl. Photo Nr. 6). Das Restriktions-Bandenmuster der mitDNS aus Zellen, die bei nicht permissiver Temperatur behandelt wurden, gleicht dem Muster unbehandelter Zellen. Weder das Auftreten neuer Banden noch eine gesteigerte Grundfluoreszenz im Gel ist zu beobachten. Daraus ist zu schließen, daß die Replikation der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur ohne Fehler bezüglich des G + C Gehalts vor sich geht.

3.4. Dichtezentrifugation von mitDNS der karyotischen Mutanten:

Die karyotisch vererbten konditionellen Mutanten tsp-20; tsp-25 und tsp-30 haben die gleichen phänotypischen Merkmale wie die oben beschriebene mitochondrial vererbte tsm-8: Alle Mutanten verlieren mitochondriale Erbinformationen bei Wachstum der Zellen in nicht permissiver Temperatur (vgl. Abb. 18). Mit Hilfe der Dichtezentrifugation sollte untersucht werden, ob die mitDNS dieser Mutanten bei nicht permissiver Temperatur repliziert wird, und ob die Replikation, soweit vorhanden, zu einer Änderung des G + C Gehalts dieser DNS führt. Dafür wurden Zellen der drei karyotischen Mutanten und der mitochondrialen getrennt mit ^{14}C -Adenin homogen markiert. Anschließend wurde der im Abschnitt 3.2. dargestellte Versuch durchgeführt. Nach Aufzeichnung der Verteilung der Radioaktivität in den Gradienten wurde, wie in der Abb. 22 dargestellt, das prozentuale Verhältnis der mitDNS zu der totDNS ermittelt. In Abb. 23 A - D stellen die offenen Kreise das Verhältnis in der Vormarkierung, die geschlossen dagegen in der Nach-

markierung dar. Bei allen Mutanten ist der prozentuale Anteil der mitDNS zu der totDNS sowohl für die Vormarkierung wie auch für die Markierung bei nicht permissiver Temperatur gleich. Daraus folgt, daß die mitDNS repliziert wird. Da kein Unterschied in der Dichte der neusynthetisierten DNS-Moleküle verglichen mit den in den Zellen schon vorhandenen festgestellt werden konnte, verursacht die Replikation, wie schon im Abschnitt 3.2. beschrieben, keine Änderung des G + C Gehalts.

3.5. Charakterisierung der mitDNS isolierter ρ^- Mutanten:

Aus den Ergebnissen der obigen Versuchsreihen kann abgeleitet werden, daß unabhängig vom karyotischen oder mitochondrialen Charakter der Mutanten die ρ^- Bildung weder durch einen Replikationsstop der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur noch durch gravierende Fehler der Replikation der mitDNS zu erklären ist. Die Experimente ließen keine Aussage zu, ob Punktmutationen in spezifischen Regionen der mitDNS oder Stückverluste von DNS-Sequenzen zur ρ^- Bildung führen. Daher wurden Zellen des Stammes RM 1431-3C (tsr-25) bei 35°C gezüchtet. Mehrere der gebildeten ρ^- Kolonien nach Plattierung auf YPDG-Medium wurden durch Kreuzung mit ρ^+ Zellen auf ihren Kodierungsgehalt hin untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tab. 3 Spalte 2 angegeben. Die Mutanten haben unterschiedliche Regionen der mitDNS zurückbehalten. Um die Länge dieser Sequenzen zu bestimmen, wurde mit Hilfe der im Abschnitt 2.3.2.2. dargestellten Methode die mitDNS dieser Mutanten isoliert, denaturiert und

auf Cellulosenitrat-Filter übertragen. Anschließend wurden die Filter mit radioaktiv markierter ρ^+ mit-c-RNS inkubiert. Die Anzahl der cpm nach Hybridisierung von ρ^+ mit-c-RNS gegen ρ^+ mitDNS wurde als 100% gesetzt und daraus der prozentuale Anteil der Hybridisierung der einzelnen Mutanten errechnet. Dieser Anteil gibt die Länge, der in der jeweiligen Mutante zurückgehaltenen mitDNS Sequenzen an. Das Ergebnis ist in Tab. 3 Spalte 3 dargestellt. Spalte 4 gibt die minimal bzw maximal Länge der jeweiligen ρ^- Mutante errechnet nach der genetischen Analyse an. Die verschiedenen Mutanten weisen unterschiedliche Hybridisierungswerte auf. Das bedeutet, daß die Mutanten mitDNS Sequenzen zurückhalten haben, die der ρ^+ mitDNS homolog sind und von Mutante zu Mutante von verschiedener Länge sind. Mit dieser Methode kann außerdem der Abstand zwischen Markern auf der mitDNS errechnet werden. (vgl. Grosch; Doxiadis; Lang; Schweyen; Kaudewitz (1977)). Dieser beträgt für die Marker cap und oxi-3 44 Hybridisierungs-Einheiten (das gesamte Genom wurde als 100 Einheiten gesetzt). Zum Vergleich beträgt dieser Abstand errechnet nach der genetischen Analyse der co-Retention von Markern in Populationen von ρ^- Mutanten 43 - 47 Einheiten (Schweyen et al. (1978)), nach der Restriktions-Analyse 46 Einheiten (Lewin et al. (1977)). Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die ρ^- Mutation bei den untersuchten Mutanten durch Makrodeletionen verursacht wird.

Aus allen hier dargestellten Experimenten unter Zuhilfenahme von bekannten genetischen Untersuchungen an diesen Mutanten (vgl. Backhaus et al. (1978); Handwerker et al. (1973) und

Schweyen et al. (1978)) kann daher geschlossen werden:

1. Unabhängig von der Vererbungsart der Mutanten ist die ρ^- Bildung nicht durch Änderung des G + C Gehalts bei der Replikation der mitDNS in nicht permissiver Temperatur verursacht.
2. Die ρ^- Bildung wird vielmehr durch Makrodeletionen verursacht. Das zurückbehaltene Segment der mitDNS in den ρ^- Mutanten enthält keine größeren internen Deletionen wie der errechnete Abstand zwischen den bekannten Markern zeigt.
3. Die ρ^- Bildung ist ein irreversibler Vorgang.
4. Alle untersuchten ρ^- Mutanten besitzen mitDNS vom gleichen Molekulargewicht wie die ρ^+ mitDNS, wie die Bandierung in den Agarose-Gelelen zeigte. Dies bedeutet, daß das zurückbehaltene Segment in reiterierter Form in den Zellen vorliegt.

3.6. Verhalten der Mutanten in nicht-vergärbarem Substrat:

Bisher wurden Ergebnisse beschrieben, welche nach Züchtung der Mutanten in vergärbarem Substrat beobachtet wurden.

Der Anteil der ρ^- Zellen in der Gesamt-Population stieg mit der Generationszeit stark an bis alle Zellen ρ^- / ρ^0 wurden. Im Gegensatz dazu können die beschriebenen Mutanten (*tsm* und *tap*) sich nicht in unvergärbarem Substrat vermehren. Dabei werden keine ρ^- Kolonien nach Plattierung der Zellen auf festem Medium gebildet (Handwerker et al. (1973); Rechmann et al. (1976); Randlow et al. (1977)).

Es stellt sich die Frage, ob das Unterbleiben der Zellteilung den Vorgang der ρ^- Bildung oder die Replikation der mitDNS verhindert. Daher wurden Zellen aller oben beschriebener Mu-

tanten (tsm-8; tsp-20; tsp-25; tsp-30) homogen mit ^{14}C -Adenin markiert. Anschließend wurden die Zellen wie schon in Abb. 19 dargestellt, abzentrifugiert und in nicht permissiver Temperatur weiterbehandelt. Zu Zeitpunkten zwischen 0 und 26 Std nach Versuchsbeginn wurden Aliquote aus den Kulturen entnommen und mit ^3H -Adenin 45 min lang markiert. Danach wurden die Zellen protoplastisiert, lysiert und in NaJ-Dichtegradienten zentrifugiert. Der prozentuale Anteil der mitDNS zur totDNS wurde, wie schon in Abb. 22 gezeigt, errechnet und gegen die Inkubationszeit bei nicht permissiver Temperatur aufgetragen (vgl. Abb. 24 A - D). Die offenen Kreise stellen die Vormarkierung, die geschlossenen dagegen die Nachmarkierung dar. Die mitDNS aller Mutanten wird bei nicht permissiver Temperatur repliziert. Der prozentuale Anteil bei dieser Synthese steigt bis zu 40% aller in der totDNS der Hefezellen eingebauten Markierung. Keine Verschiebung von mitDNS-Maxima konnte dabei beobachtet werden. Daraus folgt, daß obwohl die ρ^- Bildung unterbleibt, die mitDNS fehlerfrei bezüglich des G + C Gehalts repliziert wird. Die Erhöhung des prozentualen Anteils dieser DNS zur totDNS kann entweder durch Replikationsstop der nucDNS vorgetäuscht sein oder durch eine mutationsbedingte Erhöhung der mitDNS Syntheserate erklärt werden.

3.7. mitDNS Synthese in sich nicht-teilenden Zellen der Mutante tsm-8:

Um die Frage zu klären, ob der erhöhte Anteil der mitDNS Synthese der Mutanten tsm-8 in nicht vergärbarem Substrat durch einen Replikationsstop der nucDNS vorgetäuscht wird,

oder ob durch die Mutation die mitDNS Syntheserate tatsächlich erhöht wird, wurden folgende zwei Versuchsansätze durchgeführt:

- 1) Hemmung der nucDNS Synthese
- 2) Untersuchung der mitDNS Synthese in Zellen der Mutante tsm-8, die sich bei permissiver Temperatur in der stationären Phase befinden.

3.7.1. Hemmung der nucDNS Synthese:

Grossman et al. (1969) beschrieben eine Möglichkeit zur Hemmung der nucDNS Synthese mit Cycloheximid (CHI). Dieses Agens hemmt primär die cytoplasmatische Proteinsynthese, sekundär aber die Synthese der nucDNS ohne jegliche Auswirkung auf die mitDNS Replikation. Mit Hilfe dieses Antibiotikums sollte untersucht werden, ob durch Hemmung der nucDNS Synthese eine Erhöhung der mitDNS Synthese der Mutante tsm-8 bei permissiver Temperatur erzielt werden kann. Dafür wurden mit ^{14}C -Adenin homogen markierte Zellen des Stammes JE 1211-17 mit CHI (200 µg / ml) versetzt. Zu Versuchsbeginn und zu den folgenden Zeiten: 30 min; 60 min; 180 min; 360 min und 1140 min wurden Aliquote entnommen und für 45 min mit ^3H -Adenin markiert. Nach Darstellung der DNS im NaI-Dichtegradienten wurde der prozentuale Anteil der mitDNS zur totDNS errechnet. Abb. 25 zeigt, daß die mitDNS 40% aller in der totDNS eingebauten Markierung aufweist. Dieses Ergebnis gleicht dem schon im Abschnitt 3.6. besprochenen. Durch Hemmung der nucDNS Synthese wird eine Erhöhung der mitDNS Synthese vorgetäuscht.

3.7.2. mitDNS Synthese der Mutante tsm-8:

Zur Sicherung der Aussage, daß die Erhöhung der mitDNS Synthese durch die Hemmung der nucDNS Replikation vorgetäuscht wird, wurden Zellen des Stammes SM 1211-1B bis zur stationären Phase mit ^{14}C -Adenin markiert. 24 bzw 48 Std nach Versuchsbeginn wurden Aliquote entnommen und für 3 Std mit ^3H -Adenin markiert. Nach Darstellung der DNS in NaJ-Dichtegradienten wurde der prozentuale Anteil der in der mitDNS eingebauten Markierung zu der totDNS errechnet. Wie Abb. 26 zeigt, nimmt der Anteil der mitDNS Synthese zu.

Aus beiden Versuchsreihen kann festgestellt werden, daß die Erhöhung des relativen Anteils der mitDNS Synthese der Mutante tsm-8 nicht durch die Erhöhung der Syntheserate dieser DNS verursacht wird, sondern vielmehr durch den Replikationsstopp der nucDNS bedingt ist. Ähnliche Ergebnisse sind von Petes und Fangman (1973) nach Zugabe von alpha-Faktor und von Newlon und Fangman (1975) in Zell-Zyklus-Mutanten der Bäckerhefe publiziert worden.

3.8. Molekulargewichtsbestimmung von mitDNS der Mutanten

tsm-8 nach Inkubation in nicht vergärbarem Substrat:

Die obigen Experimente zeigten, daß die mitDNS der konditionellen Mutanten in nicht vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur repliziert wird. Die Replikation ruft keine Änderung des G + C Gehalts hervor. Im folgenden sollte das Molekulargewicht der mitDNS bestimmt werden. Dafür wurden mit ^{14}C -Adenin homogen markierte Zellen des Stammes SM 1211-1B (tsm-8) in nicht vergärbarem Substrat bei erhöhter Temperatur weiterbelüftet. Zu Versuchsbeginn und nach einer Behandlungsdauer von 24 Std wurden Aliquote entnommen, für 45 min mit ^3H -

Adenin markiert, die Zellen protoplastisiert und die Protoplasten auf Sucrose-Gradienten geschichtet. Mit einem Teil der Protoplasten-Suspension wurde die totDNS in NaJ-Dichtegradienten dargestellt. In Abb. 27 A 1,2 und 27 B 1,2 stellen die offenen Kreise die Vormarkierung, die geschlossenen dagegen die Nachmarkierung dar. Bei der Kontrolle (0 Std Behandlung bei nicht permissiver Temperatur) weist die mitDNS sowohl für die Vormarkierung als auch für die Nachmarkierung die schon im Abschnitt 1.2. besprochene Verteilung der Molekulargewichte im Sucrose-Gradienten auf (Abb. 27 A 1). Beim 24 Std Wert ist keine DNS vorhanden, die das bekannte Molekulargewicht von 50 Megadalton hat (Abb. 27 B 1). Der Dichtegradient, der mit einem Teil der Protoplasten-Suspension nach der 24 Std-Behandlung beschickt war, zeigt dagegen, daß mitDNS in den Zellen vorhanden sein muß (Abb. B 2). Zur Erklärung des Ergebnisses bieten sich folgende zwei Möglichkeiten an:

- 1) Die mitDNS hat während der Inkubation der Zellen bei nicht permissiver Temperatur an Molekulargewicht zugenommen. Da ihre Dichte sich dabei nicht verändert hat, stellt das vergrößerte Molekül eine Mehrfach-Kopie des ursprünglichen mitDNS Moleküls dar.
- 2) Die Detergenz-Schicht auf dem Sucrose-Gradienten reicht nicht aus, um die mitDNS unter den angewandten Bedingungen vollkommen proteinfrei zu halten, sodaß das Molekulargewicht der DNS stark erhöht wird.

3.8.1. Untersuchung der Proteinbindung an die mitDNS:

Um die Frage zu klären, ob das nicht Bandieren der mitDNS der Mutante tsm-8 im Sucrose-Gradienten durch starke Protein-

bindung und somit Erhöhung des Molekulargewichts verursacht wird, wurden mit ^{14}C -Adenin homogen markierte Zellen des Stammes SM 1211-1B in permissiver Temperatur mit ^3H -Leucin markiert, protoplastiert und die Protoplasten auf einen Sucrose-Gradienten geschichtet. In Abb. 28 stellen die offenen Kreise die ^3H -Markierung, die geschlossenen dagegen die ^{14}C -Markierung dar. Die ^3H -Radioaktivität ist im oberen Bereich des Gradienten, die ^{14}C dagegen im untersten Teil konzentriert. Wie schon oben beschrieben, konnte keine DNS gefunden werden, die das bekannte Molekulargewicht der mitDNS aufweist. Daraus ist abzuleiten, daß die Erhöhung des Molekulargewichts bei nicht permissiver Temperatur nicht durch starke Proteinbindung auf der mitDNS verursacht wird.

Aus diesen Ergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden:

- 1) Die mitDNS wird bei nicht permissiver Temperatur in nicht vergärbarem Substrat repliziert.
- 2) Das Produkt dieser Replikation stellt eine Mehrfach-Kopie des ursprünglichen mitDNS Moleküls dar.

DISCUSSION

A. Darstellung von mitochondrialer DNS der Bäckerhefe:

Dem ersten Teil dieser Untersuchungen war das Ziel gesetzt, eine Methode zur Isolierung von mitDNS aus Saccharomyces cerevisiae zu entwickeln, welche den bisher üblichen Überlegen ist. Sie sollte bei vertretbarem experimentellen Aufwand mitDNS i) hoher Reinheit, ii) möglichst hohen Molekulargewichtes (also nahe oder identisch dem in situ Molekulargewicht) und iii) in guter Ausbeute zu gewinnen erlauben.

Unabhängig von den verschiedenen Präparationsmethoden stellte sich die Frage des Zellaufschlusses. Mechanische Methoden wie z.B. mit Hilfe einer Stickstoff-Presse oder eines Homogenisators erbrachten geringe Ausbeuten an intakten Mitochondrien, sodaß sie für die Isolierung von mitDNS ungeeignet erschienen (Lang et al. (1977)). Enzymatische Methoden (Kováč et al. (1972)) führten zu relativ guter Mitochondrien Ausbeute, konnten aber nicht bei allen Wachstumsphasen der Hefezellen angewandt werden (Kováč et al. (1972); eigene Beobachtung). Sie erwiesen sich als geeignet für analytische Zwecke, d.h. für den Zellaufschluß von kleinen Zellmengen, bei der Untersuchung von mitDNS aus Hefezellen, die sich in der logarithmischen Wachstums-Phase befinden. Die manuell-mechanische-Methode von Lang, Burger, Doxiadis, Thomas, Bandlow, Kaudewitz (1977) entwickelt, erbrachte ähnlich gute Ausbeuten an Mitochondrien und ließ sich bei allen Wachstums-Phasen der Hefezellen anwenden. Der Hauptvorteil der Methode liegt in der Einfachheit der Durchführung und dem relativ geringen Zeit-

und Material-Aufwand. Ihre Anwendung ist nicht nur auf Saccharomyces cerevisiae begrenzt, sondern kann bei allen Hefe- und Pilz-Arten Verwendung finden (Lang et al. (1977); Ollson pers. Mitteilung).

Für die Trennung der mitDNS von den anderen DNS-Arten wurden drei, bei verschiedener Fragestellungen zu verwendende Methoden angewandt bzw. erarbeitet: i) Dichtegradienten-Zentrifugation, d.h. für die Trennung nach der jeweiligen Dichte der DNS-Moleküle ii) Sedimentations-Zentrifugation und iii) Agarose-Gel-Elektrophorese. Die beiden letzteren Methoden trennen die Moleküle nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht.

Die "klassische" Methode der Dichtezentrifugation unter Verwendung von CsCl als Träger-Salz erlaubte keine Isolierung reiner mitDNS. Grund dafür ist der relativ geringe Unterschied der Schwimmdichte von mitDNS und nucDNS der Bäckerhefe. Eine Verbesserung des Ausmaßes der Trennung durch Zusatz von Agenzien wie Eth. Br. oder DAPI gelang zwar; die Entfernung dieser Agenzien nach der Zentrifugation bedingt jedoch eine Abnahme des Molekulargewichts der zu isolierenden mitDNS.

Das von de Kloet und Andrean (1971) erstmals angewandte NaJ als Träger-Salz der Dichtezentrifugation erschien als beste Lösung für die Trennung der DNS-Arten. Die Autoren benutzten die Methode zur Isolierung von ribosomale RNS kodierender DNS (rDNS) aus Hefezellen. Die Anwendung der Methode für die Darstellung von mitDNS war bislang nur in einem Labor erfolgreich durchgeführt worden (Sanders pers. Mitteilung). Von anderen Arbeitsgruppen war diese Methode verworfen worden, da sie nach deren Erfahrungen nur mitDNS geringer Reinheit lieferte (Wil-

liamson pers. Mitteilung). Dieses Argument konnte widerlegt werden: vergleichende Untersuchungen von mitDNS isoliert nach NaF Dichtezentrifugation oder mehrfacher CsCl Dichtezentrifugation zeigen in der Restriktionsanalyse keine Unterschiede (Sanders pers. Mitteilung; eigene Beobachtung). Vielmehr bietet die Methode den Vorteil einer optimalen Trennung von mitDNS und nucDNS und ist durch die Verwendung von NaF preiswerter als die CsCl-Methode.

Die Anwendung von Sedimentationszentrifugationen in Sucrose für die Molekulargewichtsbestimmung von mitDNS war bereits mehrfach beschrieben (Blamire et al. (1972); Petes et al. (1973)) worden. Eine Isolierung von mitDNS direkt aus Sucrose-Gradienten hatte jedoch keiner der Autoren in Betracht gezogen oder gar versucht.

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Blamire et al. (1972)) wurde bei erhöhter Zentrifugationsgeschwindigkeit die hochmolekulare nucDNS durch den Gradienten auf ein im unteren Teil befindliches Sucrose-Kissen sedimentiert. Die im Gradienten bandierende mitDNS konnte isoliert werden. Diese Trennung ist optimal bei Auftragung geringer Mengen mitDNS. Größere Mengen können nicht isoliert werden, da dabei eine Überladung des Gradienten verursacht wird.

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Methode wurde die Trennung der DNS-Arten nach deren Größe angestrebt: Protoplasten oder Mitochondrien wurden direkt auf Agarose-Gele lysiert. Nach der Elektrophorese konnten zwei Banden als DNS-enthaltend identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen: i) die obere Bande stellt mitDNS dar, ii) diese ist rein,

d.h. ohne Kontamination mit den anderen DNS-Arten der Zellen und
iii) das Molekulargewicht der DNS in der Bande ist im Bereich
von 50 Megadalton. Eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts
war wegen der relativ geringen Auflösung des Gels in diesem
Bereich nicht möglich. Diese Methode ist den bislang publi-
zierten weit überlegen:

- 1) Sie ist schnell, einfach und für verschiedene Stämme gleich-
zeitig durchführbar, da Platten-Gele Anwendung finden.
- 2) Sie ist für präparative wie für analytische Zwecke ver-
wendbar.
- 3) Die mitDNS liegt in der Bande in konzentrierten Form vor,
sodaß ihre Aufbewahrung in diesem Zustand möglich ist.
- 4) Hybridisierungs- und Restriktions-Experimente können mit
der im Gel befindlichen DNS durchgeführt werden (vgl.
Grosch et al. (1977)).

B. Untersuchungen an konditionellen Mutanten der Bäckerhefe:

Mit Hilfe der im ersten Teil der Diskussion beschriebenen Me-
thoden wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit Ver-
änderungen an der mitDNS konditioneller Mutanten (tsm-8;
tsp-20; tsp-25 und tsp-30) untersucht. Genetische Analysen
hatten eine starke Erhöhung der ρ^- Bildung dieser Mutanten
nach Wachstum der Zellen bei 35°C bewiesen.

Es war zu klären, ob der bei diesen Mutanten ablaufende Pro-
zeß zu dem gleichen Typ von ρ^- Mutanten führt wie der durch
Eth. Br. induzierte (Deletionen großer Teile der mitDNS Se-
quenzen und Reiteration von überlebenden Bruchteilen des
 ρ^+ Genoms) oder ob andere Vorgänge, z.B. Replikationsstop

oder grob-fehlerhafte Replikation verantwortlich sind. Hinweise auf solche Vorgänge bei spontaner Entstehung von ρ^- Mutanten wurden von Rabinowitz et al. (1976) gegeben. Die Untersuchung beinhaltet Analysen der mitDNS mit Hilfe der Dichtezentrifugation, Sedimentation in Sucrose und Hybridisierung der ρ^- mitDNS mit ρ^+ mit-c-RNS.

Der Befund, daß alle untersuchten Mutanten bei 35°C mitDNS-Synthese aufweisen, schloß Replikationsstop als Erklärung der ρ^- Bildung aus. Grob-fehlerhafte Replikation als Ursache für die ρ^- Bildung schied aus folgenden Gründen aus: i) Die bei 35°C synthetisierte mitDNS hatte die gleiche Dichte, wie die bei permissiver Temperatur synthetisierte, und ii) Restriktionsanalyse der mitDNS nach Behandlung der Zellen bei nicht permissiver Temperatur erbrachte das gleiche Muster, wie die bei permissiver Temperatur synthetisierte mitDNS.

Die mitDNS aller untersuchten ρ^- Mutanten, die genetische Marker zurückbehalten hatten, zeigten: i) Hybridisierung mit ρ^+ mit-c-RNS, ii) einen prozentualen Anteil dieser Hybridisierung kleiner als 100% (= Hybridisierung von ρ^+ mitDNS zu ρ^+ mit-c-RNS) und iii) bei Hybridisierung von ρ^-_x mitDNS / ρ^-_y mit-c-RNS einen relativen Anteil kleiner als 100% (= Hybridisierung von ρ^-_y mitDNS zu ρ^-_y mit-c-RNS). Damit wiesen die untersuchten ρ^- Mutanten mitDNS Moleküle auf, die homolog zu ρ^+ mitDNS Teilsequenzen sind. Diese Sequenzen sind von unterschiedlicher Länge und beherbergen verschiedene Regionen der ρ^+ mitDNS. Unter Einbeziehung der Daten der genetischen Analyse kann ausserdem geschlossen werden, daß die zurückbehaltenen Sequenzen kontinuierlich, d.h. ohne interne Deletionen, sind.

Grosch et al. (1977) konnten auf Grund dieser Aussagen eine Hybridisierungskarte der mitDNS erstellen, d.h. die in einer Serie von verschiedenen ρ^- Mutanten zurückbehaltenen ρ^+ mitDNS Sequenzen ließen sich unter Einbeziehung der Daten: i) zur Länge dieser Sequenz, ii) zur Überlappung solcher Sequenzen verschiedener ρ^- Mutanten und iii) zum genetischen Kodierungsgehalt widerspruchsfrei auf einer zirkulären Karte der mitDNS anordnen. Diese Karte steht in guten Einklang mit Karten, die nach anderen Methoden (Genetische Analysen der co-Retention von Markern in Populationen von ρ^- Mutanten (Schweyen et al. (1978)); Restriktions-Analyse (Borst et al. (1977))) erarbeitet wurden.

Es konnte ausserdem festgestellt werden, daß alle untersuchten Mutanten mitDNS Moleküle enthalten, deren Mobilität im Agarose-Gel den ρ^+ mitDNS Molekülen gleicht. Die ρ^- mitDNS Moleküle weisen somit ein Molekulargewicht von der gleichen Größenordnung wie das ρ^+ Molekül auf. Diese Aussage steht im Einklang mit Befunden anderer Autoren (Linnane et al. (1976); Borst et al. (1977)), und läßt eine Reiteration der zurückbehaltenen Sequenzen vermuten wie schon durch Eth. Br. induzierten Mutanten nachgewiesen wurde (Faye et al. (1973)). Diese Reiteration der zurückbehaltenen Sequenzen wird sehr schnell durchgeführt, wie die Sedimentationsanalysen der konditionellen Mutanten nach Behandlung bei nicht permissiver Temperatur aufzeigten.

Nach Behandlung der konditionellen Mutanten in nicht vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur, d.h. in Be-

dingungen bei denen die Zellen kein Wachstum zeigen, ist die mitDNS Replikation aktiv. Der scheinbar sprunghafte Anstieg im Verhältnis der Menge dieser DNS zu der totDNS (von 15 % auf etwa 40%) ist durch den Replikationstop der nucDNS zu erklären. Ähnliche Befunde konnten mit stationären Zellen der Mutanten bei permissiven Bedingungen nach Hemmung der Protein-Synthese durch das Antibiotikum Cycloheximid (CHI) oder nach Behandlung von Zellen des Paarungstyps a mit dem alpha-Protein erhoben werden. Im Gegensatz dazu wird bei den Mutanten unter nicht permissiven Bedingungen eine mitDNS vorgefunden, deren Molekulargewicht im Vergleich zu ρ^+ mitDNS um mehr als das 5-fache gesteigert ist. Die Dichte dieser (bei nicht permissiver Temperatur synthetisierten) DNS ist aber gleich der ρ^+ mitDNS. Diese Erhöhung des Molekulargewichts ist die einzige bisher nachgewiesene Veränderung an der mitDNS dieser Mutanten während der Inkubation bei 35°C. Die Erhöhung allein führt aber nicht zur ρ^- Bildung, denn die Zugabe von Glucose zu den in nicht vergärbarem Substrat behandelten Zellen mit gleichzeitiger Temperaturniedrigung erbrachte keine Erhöhung des ρ^- Anteils in der Gesamt-Population (Bandlow et al. (1977)). Die Zunahme des Molekulargewichts der mitDNS bei nicht permissiven Bedingungen kann als Hinweis auf eine unidirektionale Replikation dieser DNS verstanden werden. Die Vergrößerung des Molekulargewichts der mitDNS bei nicht permissiver Temperatur unterscheidet sich von allen bisher gezeigten Ergebnissen mit Eth. Br. oder UV-Licht. Es stellt sich die Frage, warum keine Vergrößerung des Molekulargewichts der mitDNS bei in Glucose gewachsenen, den Prozeß der ρ^- Bildung

durchlaufenden, Zellen gefunden werden konnte. Anscheinend wird durch die Knospung der Mitochondrien und Verteilung der Moleküle auf die Tochter-Mitochondrien eine Verringerung des Molekulargewichts der mitDNS erzielt.

Borst et al. (1977) schlagen für die mitDNS einen "sizing step" vor. Dieser Vorgang soll dafür zuständig sein, daß die mitDNS immer ein Molekulargewicht von 50 Megadalton beibehält. Damit ist zu erklären, warum alle bisher untersuchten ρ^- mitDNS Moleküle ein Molekulargewicht von max. 50 Megadalton haben, obwohl diese nur einen Teil der in der ρ^+ mitDNS beinhaltenden Sequenzen haben. Für die Erklärung der ρ^- Bildung der konditionellen Mutanten bei nicht permissiver Temperatur wird folgendes Modell vorgeschlagen:

" Die Beendigung der mitochondrialen Replikation ist bei diesen Zellen gestört. Die Störung kann entweder durch eine Mutation der Gene für eines der zuständigen Polypeptide direkt verursacht sein, oder durch Änderung der mitochondrialen Membran indirekt, d.h. sekundär, erzielt werden."

Der "sizing step" ist nur bei Wachstum bzw. Teilung der Zellen, aktiv, sodaß die resultierenden Moleküle das Molekulargewicht von etwa 50 Megadalton haben. Bei Nicht-Teilung der Zellen ist dieser Schritt von untergeordneter Bedeutung, da die DNS entweder nicht repliziert wird oder der Mechanismus zur Beendigung der Replikation funktionsfähig ist, sodaß wiederum die resultierenden Moleküle ein Molekulargewicht von etwa 50 Megadalton haben.

Bei Wachstum der Mutanten in nicht permissiver Temperatur haben

alle Moleküle ein Molekulargewicht von etwa 50 Megadalton (in dieser Arbeit nachgewiesen), weil der "sizing step" aktiv ist. Bei Behandlung der Zellen in nicht vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur (= Nicht-Wachstum) wird das Molekulargewicht zunehmen, weil der "sizing step" wie oben schon erwähnt nicht aktiv ist, und die Beendigung der Replikation gestört ist (was den erzielten Ergebnissen entspricht).

Die Replikation der mitDMS der konditionellen Mutanten bei nicht permissiver Temperatur in vergärbarem Substrat ist genauso gestört wie bei der Behandlung in nicht vergärbarem Substrat, nur daß der "sizing step" größere als 50 Megadalton Moleküle verkleinert und kleinere reiteriert und dadurch die ρ^- Bildung verursacht. Bei weiterer Behandlung der Zellen unter nicht permissiver Temperatur würden auch Sequenzen verlorengehen, die für die Membran-Bindung der DMS notwendig sind (Williamson et al. (1977)). Die resultierenden Zellen haben also keine mitDMS mehr.

Mit diesem Modell können alle in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse erklärt werden:

- 1) Replikation der mitDMS konditioneller Mutanten bei nicht permissiver Temperatur.
- 2) Erhöhung des Molekulargewichts der mitDMS nach Behandlung der Zellen in nicht vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur.
- 3) Das Zurückbehalten von ρ^+ mitDMS homologen Sequenzen in den ρ^- Mutanten.

Folgende Voraussagen können von diesem Modell abgeleitet werden:

- 1) Die Replikation der mitDMS hat einen definierten Anfang

(ori) und Ende (ter). Sie ist unidirektional und scheint dem "rolling circle" Modell ähnlich zu sein.

- 2) Die in der Nähe von ori befindlichen Sequenzen müssen eine etwas erhöhte Wahrscheinlichkeit haben zurückbehalten zu werden.
- 3) Es müssen Mutanten auffindbar sein, deren Reiteration der zurückbehaltenen Sequenzen gestört ist, wie auch solche in denen der Mechanismus des "sizing step" defekt ist.
- 4) Es müssen auf der mitDNS Sequenzen vorhanden sein, die an Stelle des Origins erkannt werden.

Weitere Untersuchungen an der mitDNS von Saccharomyces cerevisiae werden darüber entscheiden, ob das hier vorgeschlagene Modell der ρ^- Bildung bei konditionellen Mutanten seine Richtigkeit hat.

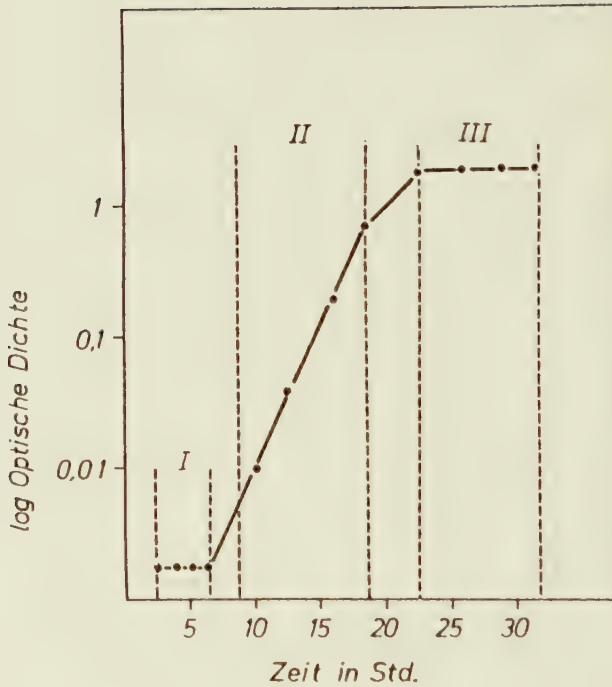


Abb. 1: Wachstumskurve einer Hefekultur des Stammes SM 551 in YPG-Medium. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen und ihre optische Dichte bei 578 nm bestimmt.

I: Lag-Phase; II: logarithmische Phase; III: stationäre Phase.

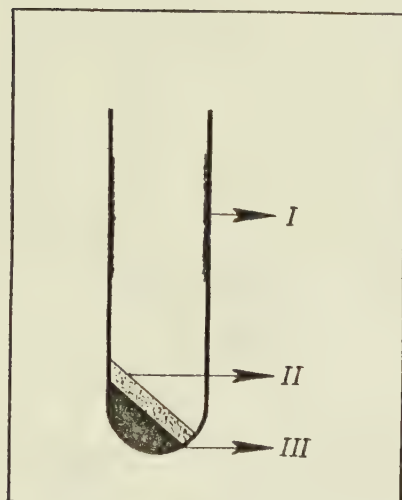


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Zentrifugationsröhrchens nach Zentrifugation einer mit der manuell-mechanischen Methode behandelten Hefekultur, bei 48 000 x g.

I: Protein-Film; II: Mitochondrien-Pellet; III: Zell-Fragmente und Glasperlen.

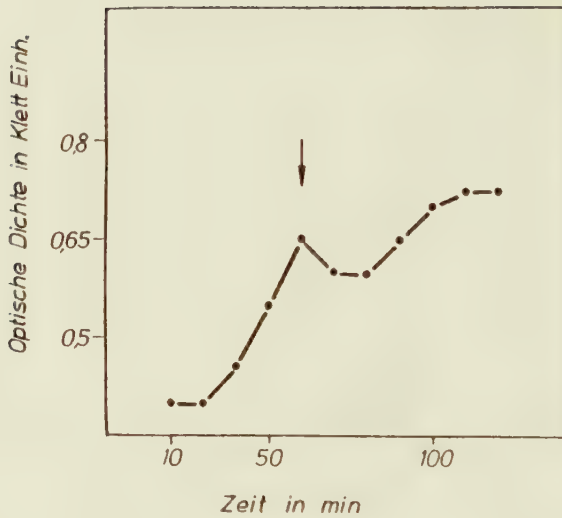


Abb. 3: Verlauf der optischen Dichte einer bakteriellen Kultur des Stammes C 600 su_{III}⁺ (λ c_I 857 Sam7). Pfeil zeigt die Erhöhung der Temperatur (Phageninduktion).

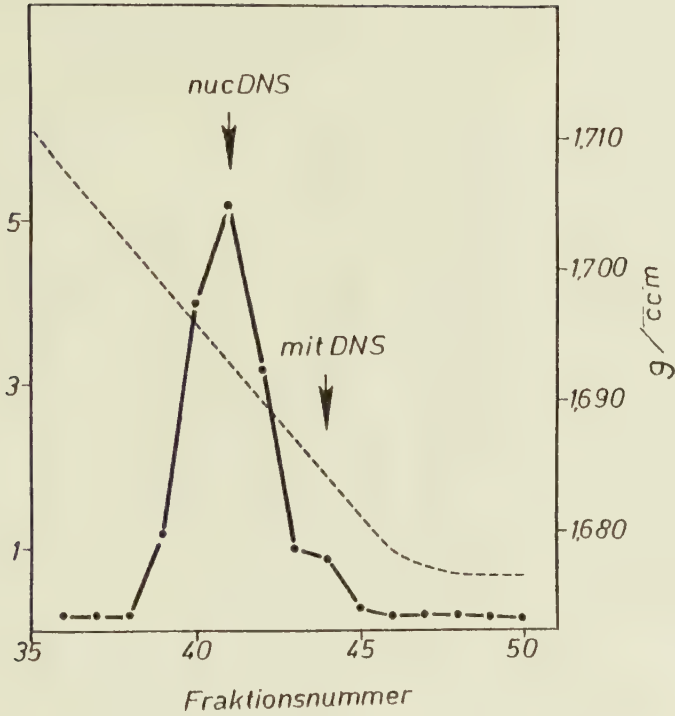


Abb. 4: Trennung von nuc und mitDNS in CsCl. Zellen des Stammes DT 6 wurden über Nacht mit ^3H -Adenin (10 $\mu\text{Ci/ml}$) in Glycerin-Minimal-Medium markiert. Anschließend wurden sie protoplastisiert, lysiert und die Nukleinsäuren mit Phenol extrahiert. Die mittlere Dichte des Gradienten betrug 1,699 g/ccm. Nach der Zentrifugation und Fraktionierung des Gradienten wurde NaOH (1N Endkonzentration) zugegeben und die Proben bei 60°C 60 min behandelt. Anschließend wurde durch Zugabe von TCA die DNS gefällt, filtriert, mit TCA und Äthanol gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

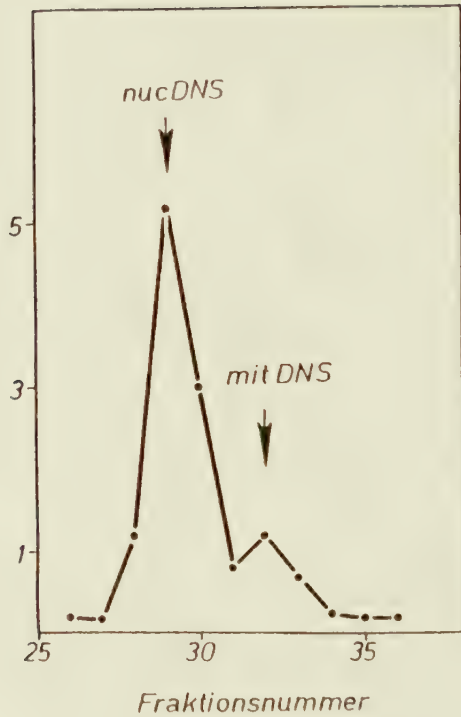


Abb. 5: Trennung der DNS-Arten in CsCl / Eth.Br.. Die Zellen wurden, wie unter Abb. 4 angegeben, behandelt. Die mittlere Dichte des Gradienten betrug 1,599 g / ccm. Die Behandlung des Gradienten ist unter Abb. 4 angegeben.



Abb. 6: Scanogram der Photographie eines mit totDNS beladenen CsCl / Eth. Br. Gradienten. Die mittlere Dichte des Gradienten betrug 1,599 g / ccm. Die Zentrifugation erfolgte für 63 Std. bei 36 000 Upm in einem Ti 50 Rotor. I: nucDNS; II: mitDNS.

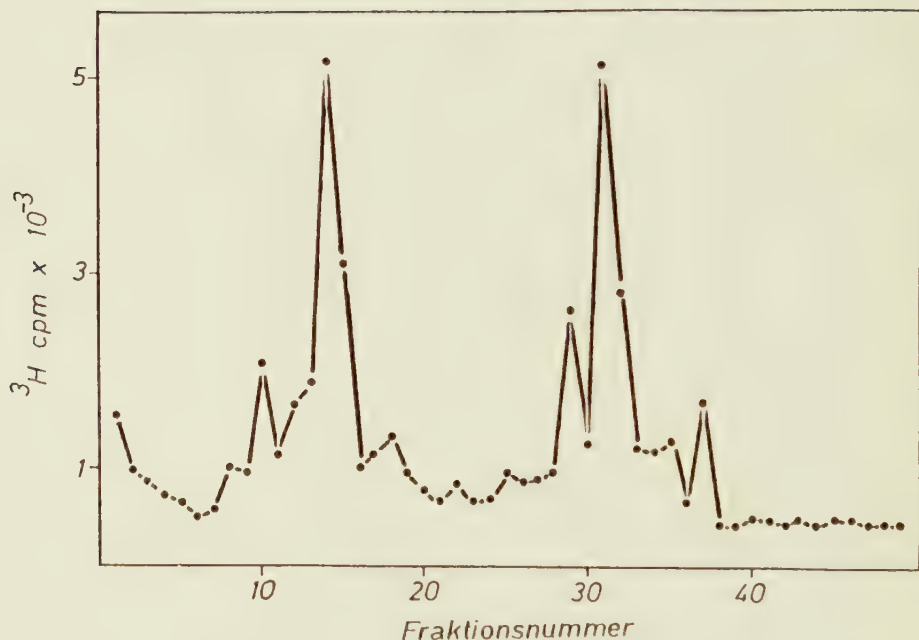


Abb. 7: Sedimentationszentrifugation von lysierten Proto-
plasten des Stammes SM 1211-1B in Sucrose-Gradienten
(5 % - 25 %). Markierung der Zellen sowie Behandlung
des Gradienten ist in Abb. 4 beschrieben. Die Zentri-
fugationsgeschwindigkeit betrug 11 000 Upm bei
20°C.

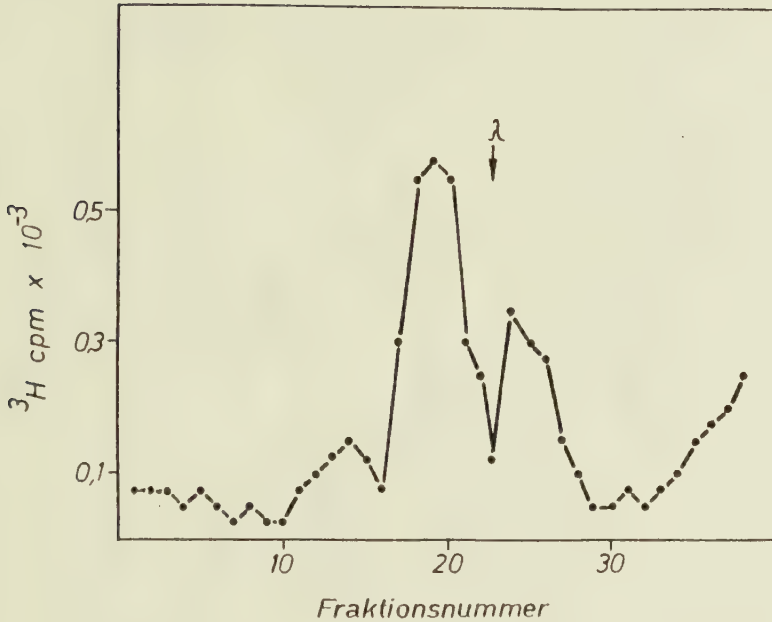


Abb. 8: Sedimentationszentrifugation von DNS aus isolierten Mitochondrien im Sucrose-Gradienten (5 % - 25 %). Zellen des Stammes A 364 A wurden wie in Abb. 4 beschrieben mit ^3H -Adenin markiert. Die Mitochondrien wurden nach Protoplastierung der Zellen gewonnen. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit betrug 17 000 Upm. Der Pfeil stellt das Maximum der Referenz DNS (λ -DNS) dar.

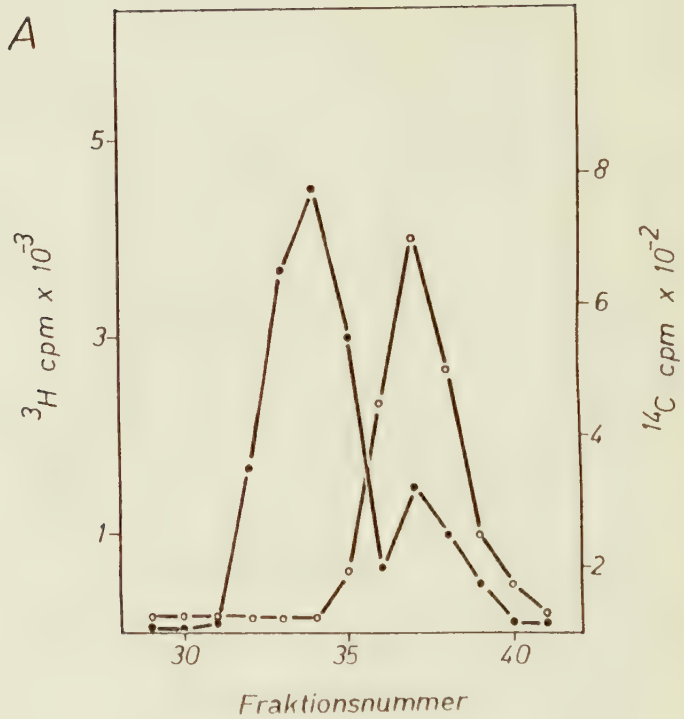
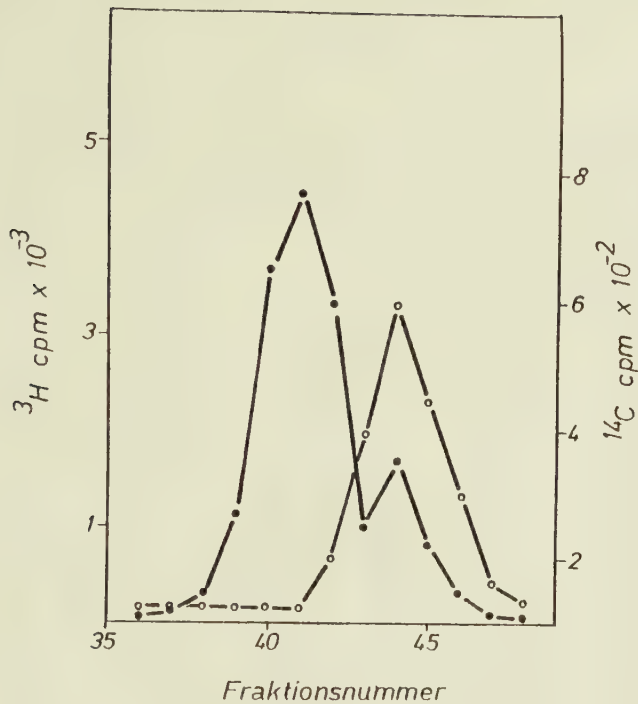


Abb. 9: CsCl / Eth. Br.-Dichtezentrifugation von DNS aus
Fraktionen des in Abb. 8 dargestellten Sucrose-
Gradienten (o—o) unter Zugabe von ^{14}C totDNS
(●—●).

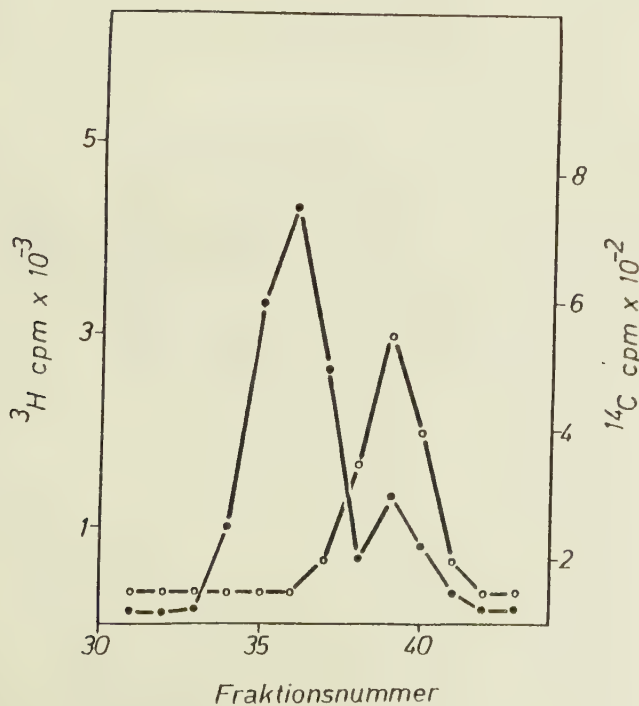
A: Fraktionen 10 - 16; B: 17 - 23; C: 24 - 28.

B

- 71 -



C



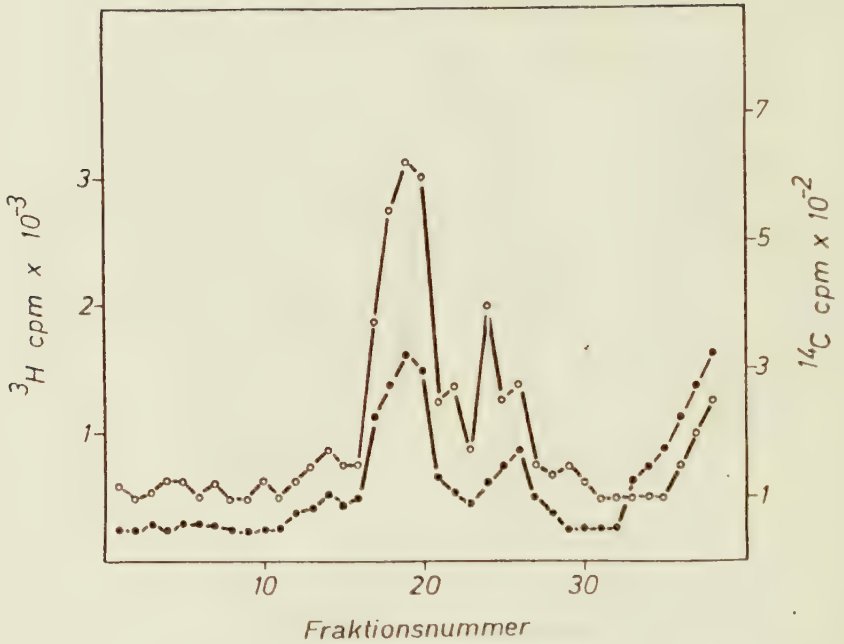


Abb. 10: Sedimentationszentrifugation von mitDNA isoliert aus Mitochondrien nach der enzymatischen Methode (^{14}C -Adenin; 1 μCi / ml markiert; $\bullet\text{---}\bullet$) oder nach der manuell-mechanischen (^3H -Adenin; 10 μCi / ml; $\circ\text{---}\circ$). Aufarbeitungsvorgänge sind in den Abb. 2; 4 und 8 wiedergegeben.

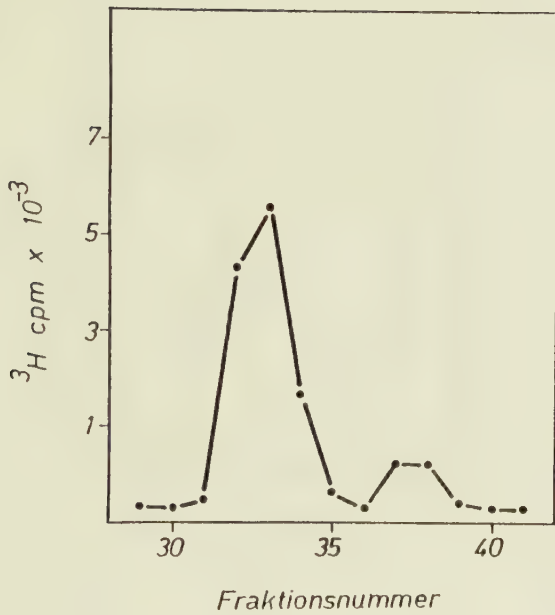


Abb. 11: CsCl / DAPI Dichtezentrifugation von totDNS. Für Angaben über Aufarbeitung der DNS vgl. Abb. 4. Die mittlere Dichte des Gradienten betrug 1,599 g / ccm.

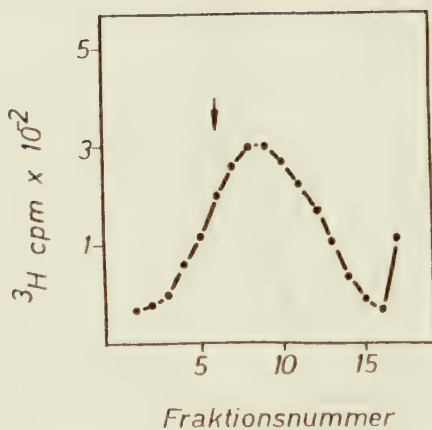


Abb. 12: Sedimentationszentrifugation von mitDNS im Sucrose-Gradienten (5 % - 20 %), nach Isolierung durch CsCl / DAPI und Entfernung des Agens aus der DNS. Die Zentrifugation erfolgte für 60 min bei 30 000 Upm in einen SW 50.1 Rotor. Der Pfeil stellt die Referenz DNS (col E1 DNS) dar.

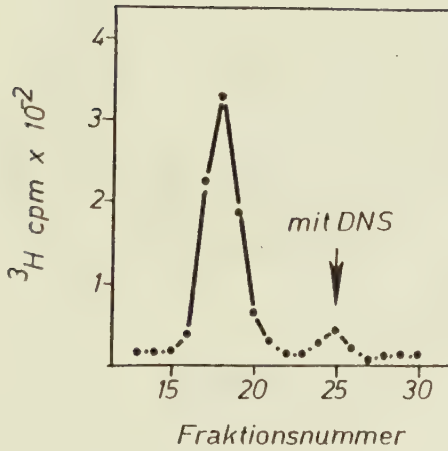


Abb. 13: Dichtezentrifugation mit NaJ. Behandlung der Zellen und des Gradienten ist in Abb. 4 beschrieben.

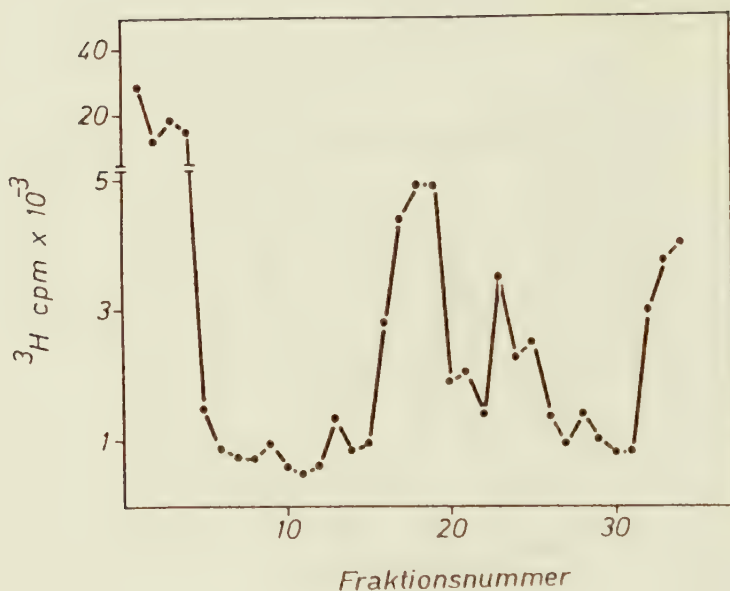


Abb. 14: Sedimentationszentrifugation von lysierten Hefeprotoplasten des Stammes SM 1211-1B im Sucrose-Gradienten (5 % - 25 %). Markierung der Zellen sowie Behandlung des Gradienten ist in Abb. 4 angegeben. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit betrug 17 000 Upm.

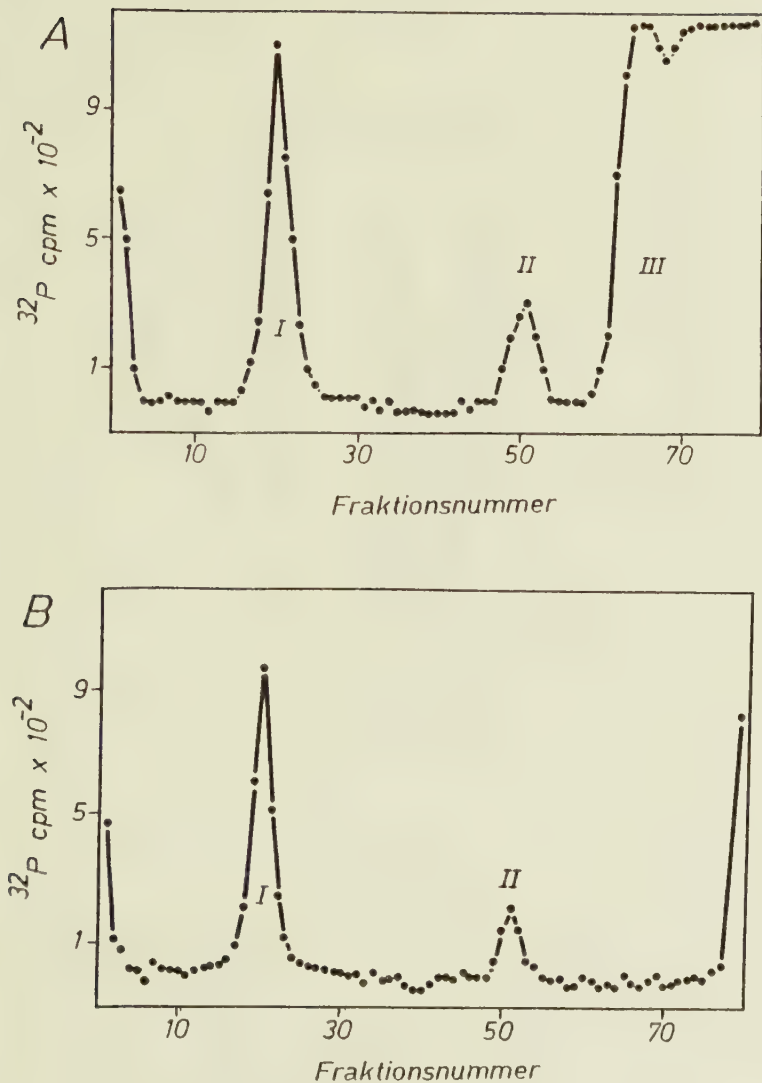


Abb. 15: Agarose-Gel-Elektrophorese eines mit ^{32}P markierten Hefezell-Lysats. Die Elektrophoresedauer betrug 3 Std. bei einer Stromstärke von 5 mA / Gel.
A: nicht behandelte Gel-Hälfte; B: mit NaOH behandelte Gel-Hälfte.

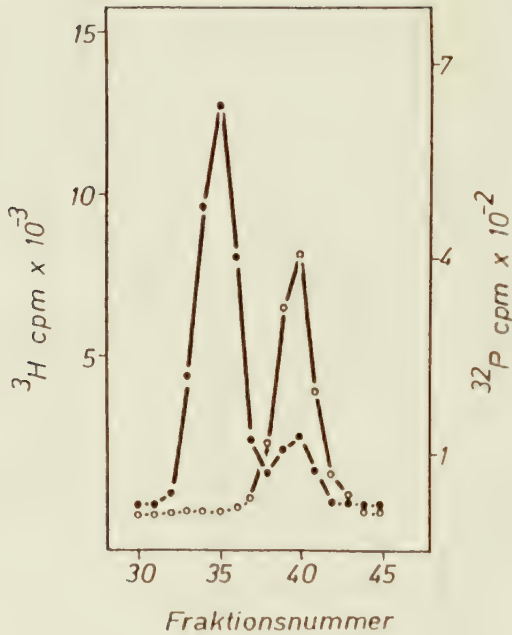


Abb. 16: NaJ-Dichtezentrifugation von DNS aus einem Agarose-Gel. Die Gel-Elektrophorese wurde wie unter Abb. 15 durchgeführt, die DNS-Bande I aus dem Gel herausgeschnitten und in NaJ gelöst. Der Refraktometer-Index der Lösung wurde nach Zugabe von ^3H totDNS auf 1,4295 eingestellt. Behandlung des Gradienten ist wie unter Abb. 4 durchgeführt worden.

o-o = DNS aus Bande I

●-● = totDNS

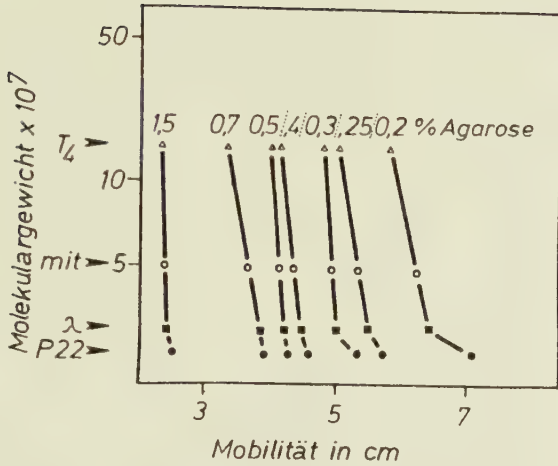


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der mitDMS im Gel. Hefeprotoplasten wurden direkt auf Agarose-Gele von verschiedenen Konzentrationen lysiert und mit T₄ (Δ) λ(■) und P22 (●) coelektrophorisiert. Der Abstand der jeweiligen Banden vom Anfang des Gels wurde gemessen und gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen.

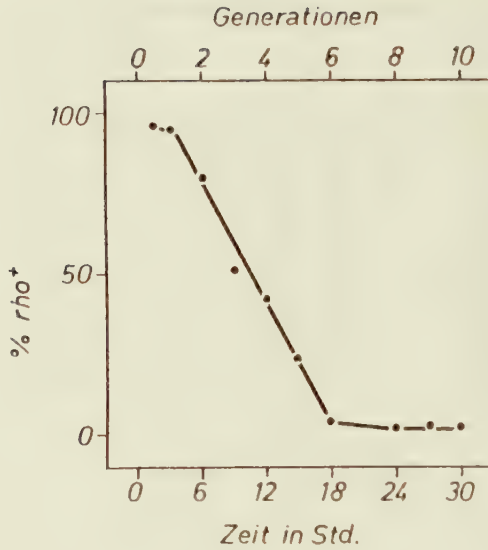


Abb. 18: Kinetik der ρ^- Bildung einer konditionellen Mutante, (SM 1211-1R, tsm-8) während des Wachstums in vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur. Aliquote wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und auf differentiellles Medium plattiert (Reichmann et al. (1977)).

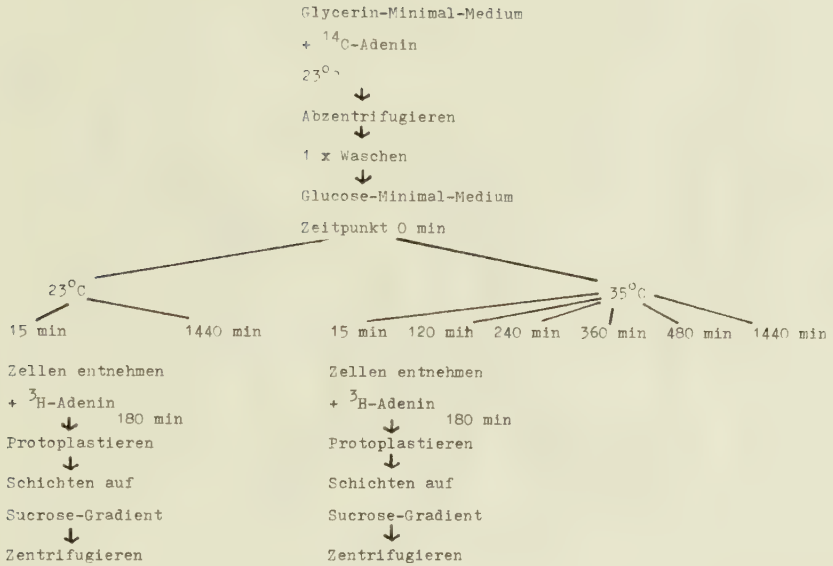


Abb. 19: Schematische Darstellung eines Markierungsversuchs
der DNS einer konditionellen Mutante.

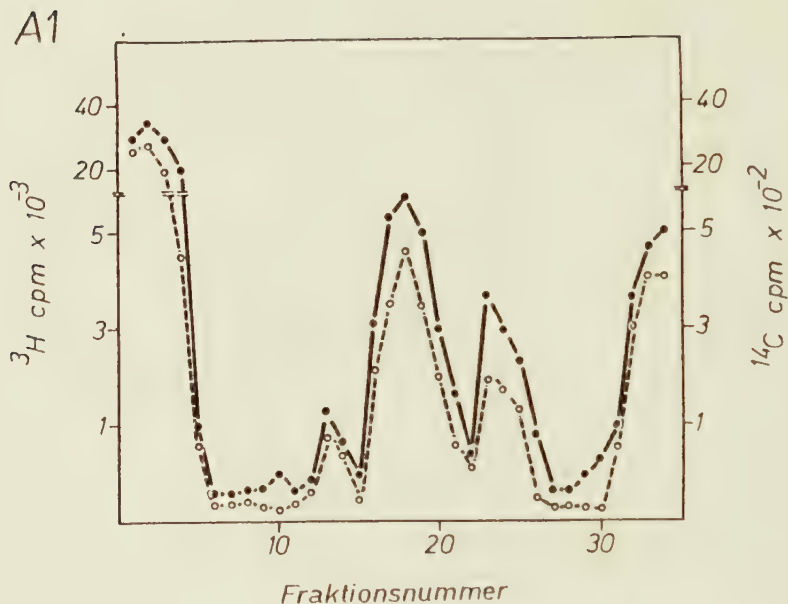
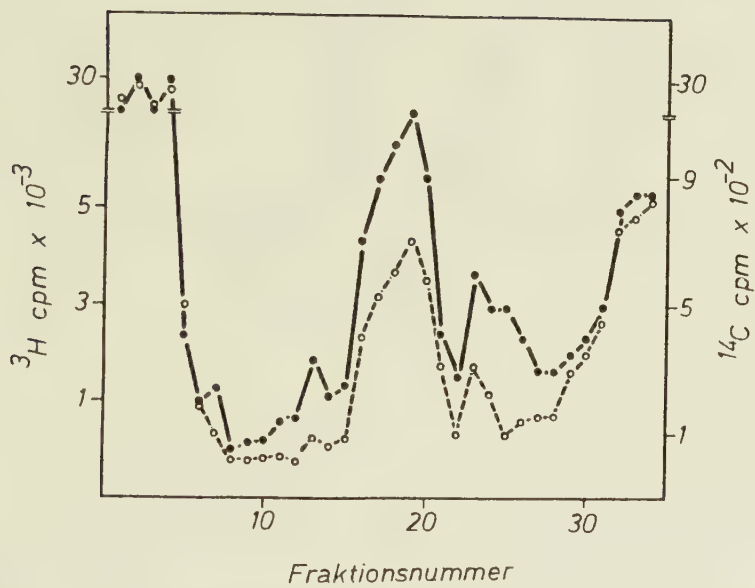


Abb. 20: Sedimentationszentrifugation von mitDNA aus lysierten Hefeprotoplasten der Mutante SM 551 nach Wachstum bei nicht permissiver Temperatur in vergärbarem Substrat. Der Versuchsablauf ist in Abb. 19, die Behandlung der Gradienten in Abb. 14 angegeben. (o---o Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin; ●—● Nachmarkierung mit ^3H -Adenin)

A: Nachmarkierung bei 23°C 1) Zeitpunkt 15 min nach Versuchsbeginn 2) 1440 min nach Versuchsbeginn.

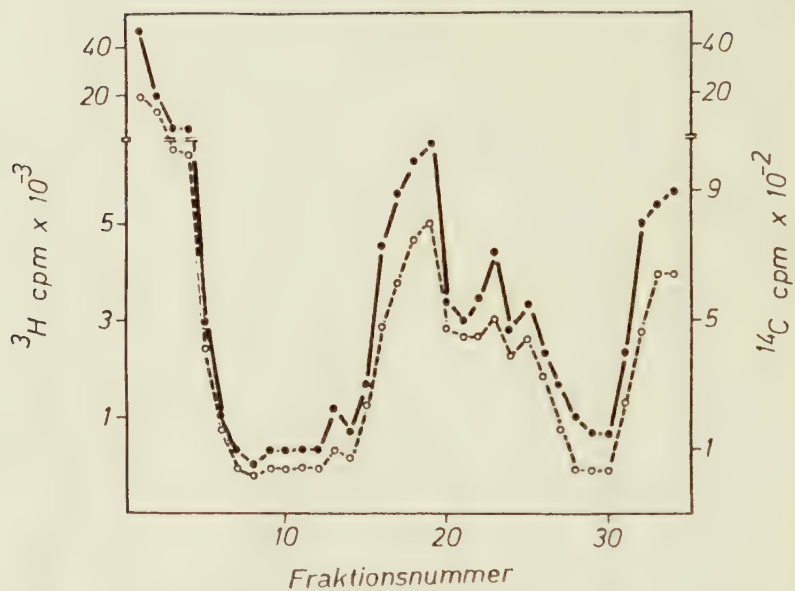
B: Nachmarkierung bei 35°C zu den Zeiten 1) 15 min 2) 120 min 3) 240 min 4) 360 min 5) 480 min 6) 1140 min.

A2



B1

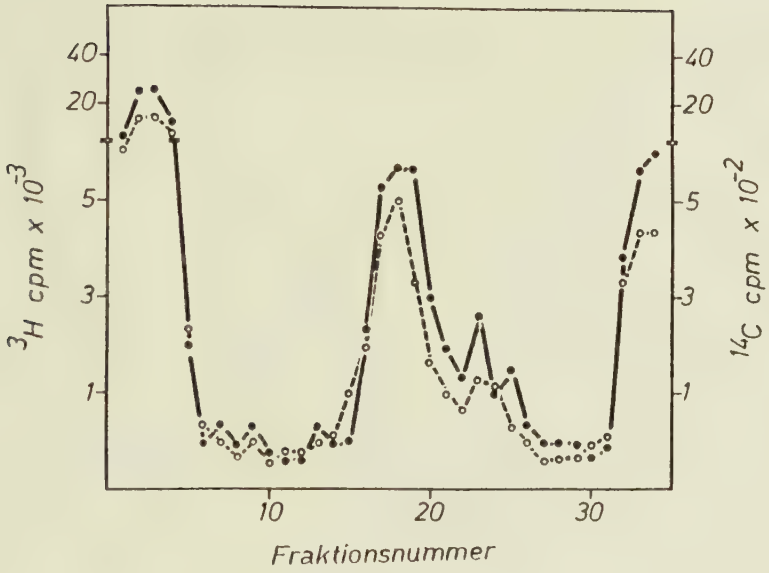
- 84 -



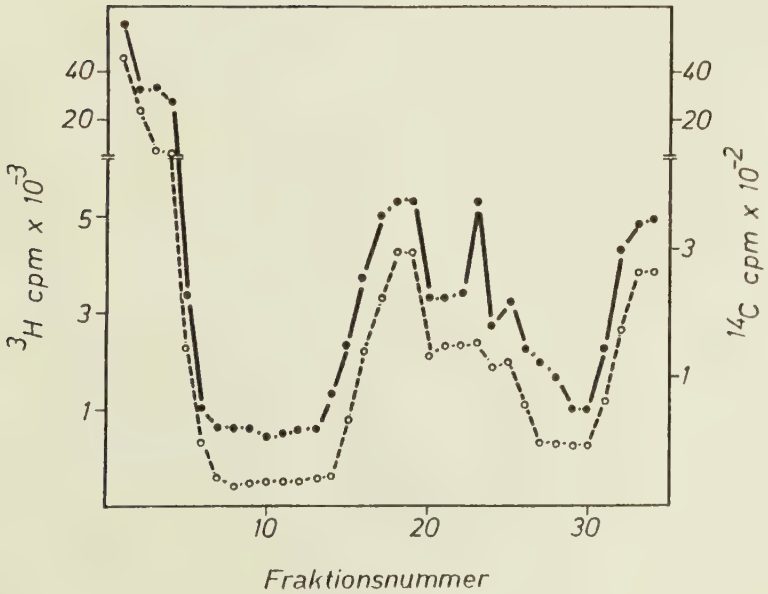
2



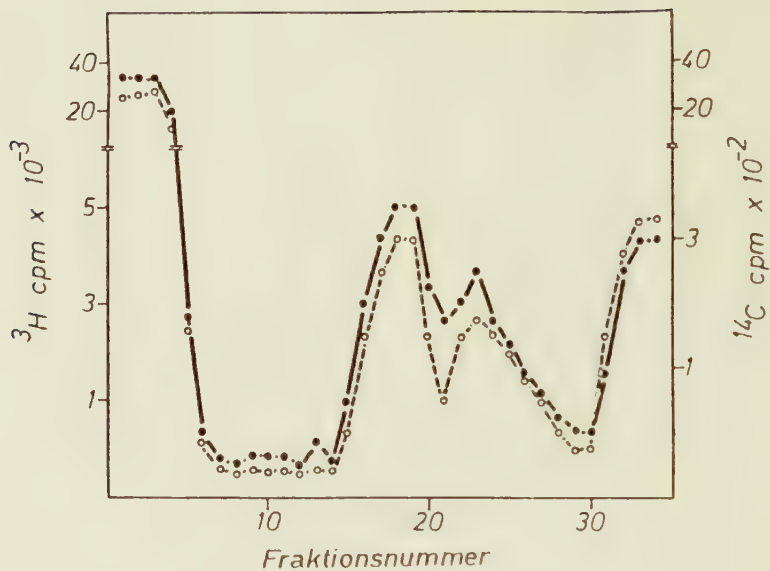
B3



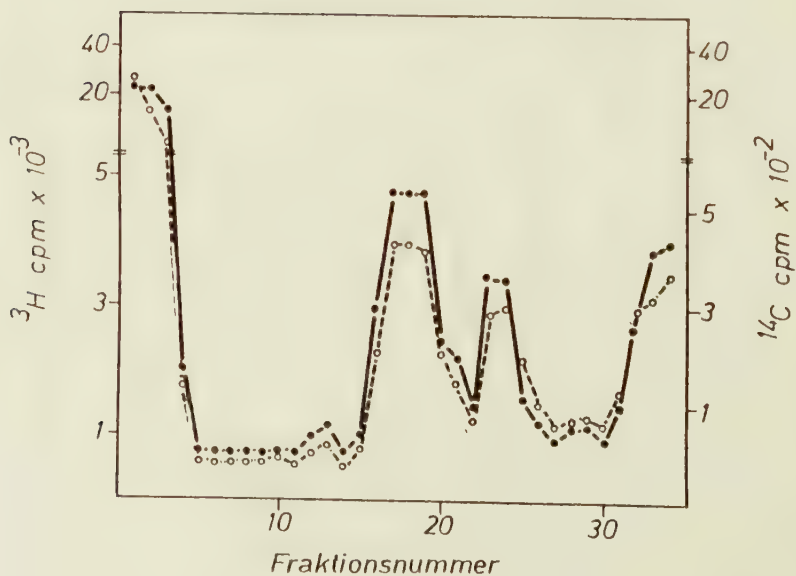
4



B5



6



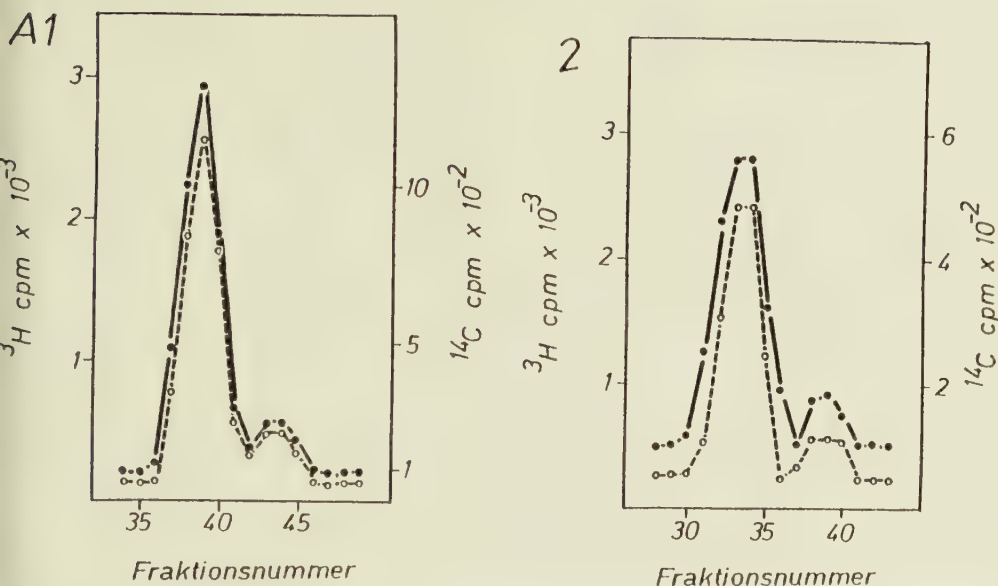


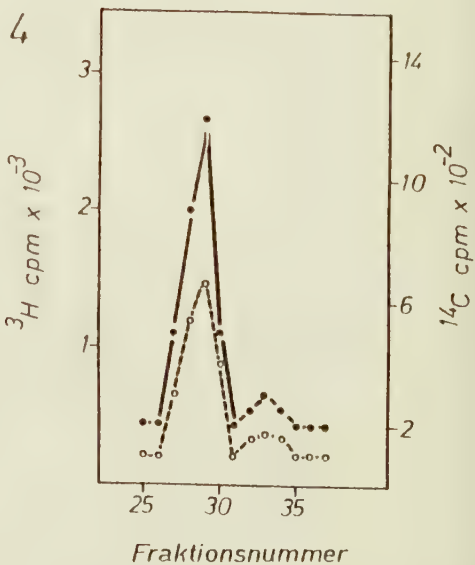
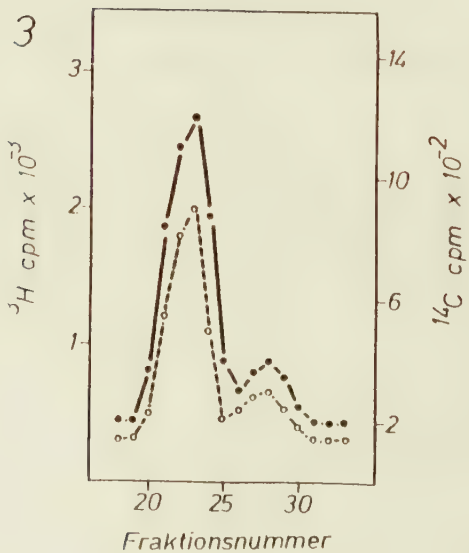
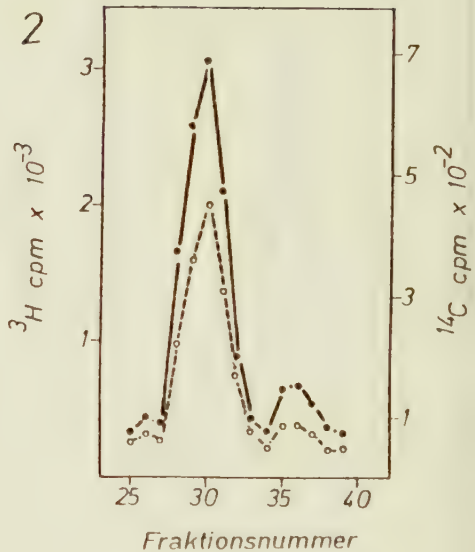
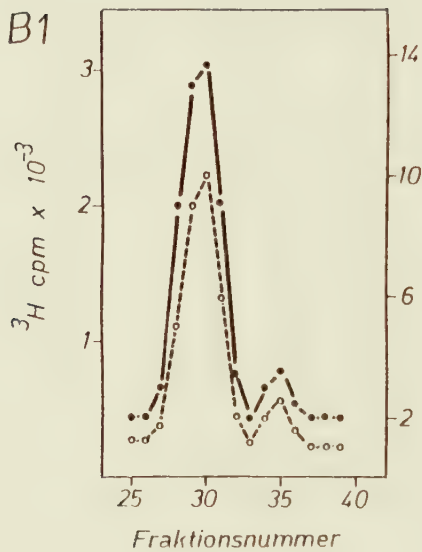
Abb. 21: CsCl / DAPI-Dichtezentrifugation von totDNS der Mutante SM 1211-1B (tsm-8) nach Wachstum bei nicht permissiver Temperatur in vergärbarem Substrat. Versuchsablauf sowie Behandlung der Gradienten ist unter Abb. 20 angegeben.

A: Wachstum bei 23°C 1) 15 min nach Versuchsbeginn
2) 1440 min nach Versuchsbeginn.

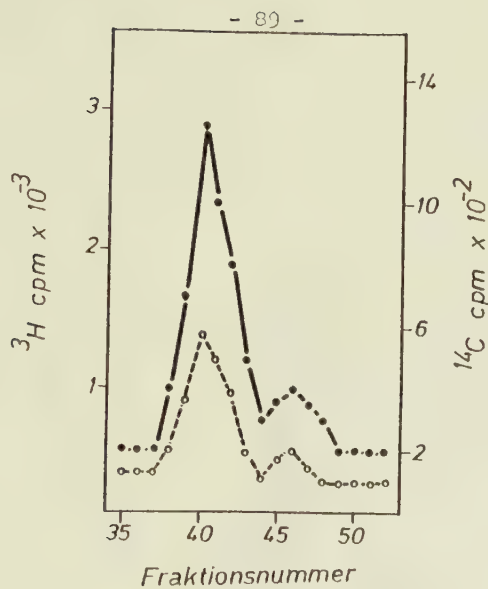
B: Wachstum bei 35°C . Nachmarkierung zu den Zeiten:
1) 15 min 2) 120 min 3) 240 min 4) 360 min
5) 480 min 6) 1440 min.

Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin o---o

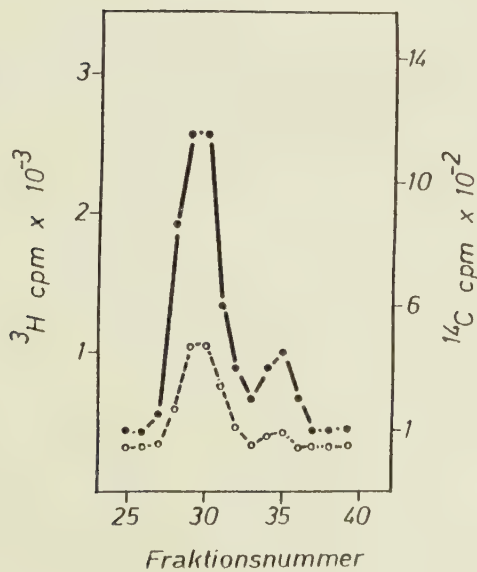
Nachmarkierung mit ^3H -Adenin o—o



B5



6



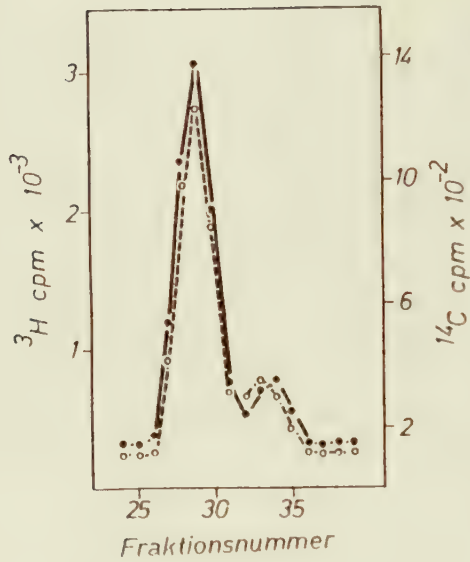


Abb. 21 C: CsCl / DAPI-Dichtezentrifugation von totDNS einer stabilen rho⁻Mutante (BM 1421-1C) (^3H -Adenin o---o) und der tsm-8 nach Wachstum bei 23°C (^{14}C -Adenin ●—●).

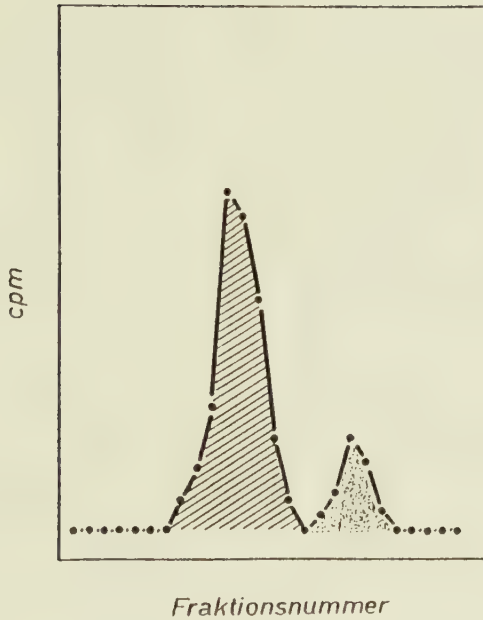


Abb. 22: NaJ-Dichtezentrifugation von totDNS. Die Berechnung des prozentualen Anteils der mitDNS wurde nach Addition aller cpm von beiden Maxima durchgeführt.

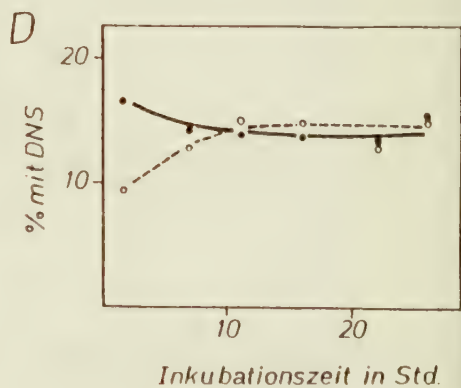
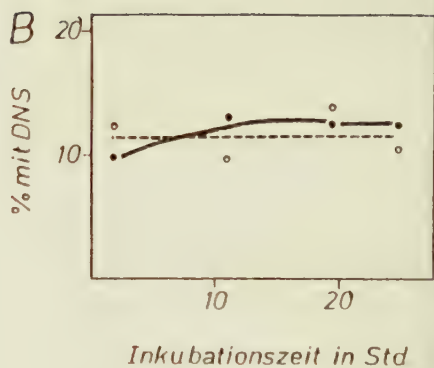
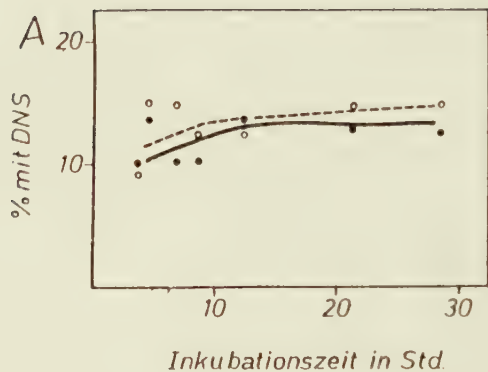


Abb. 23: Kinetik des prozentualen Anteils von mitDNS beim Wachstum der Zellen in vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur.

A: tsm-8; B: tsp-20; C: tsp-25; D: tsp-30.

●—● Nachmarkierung mit ^3H -Adenin

○---○ Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin

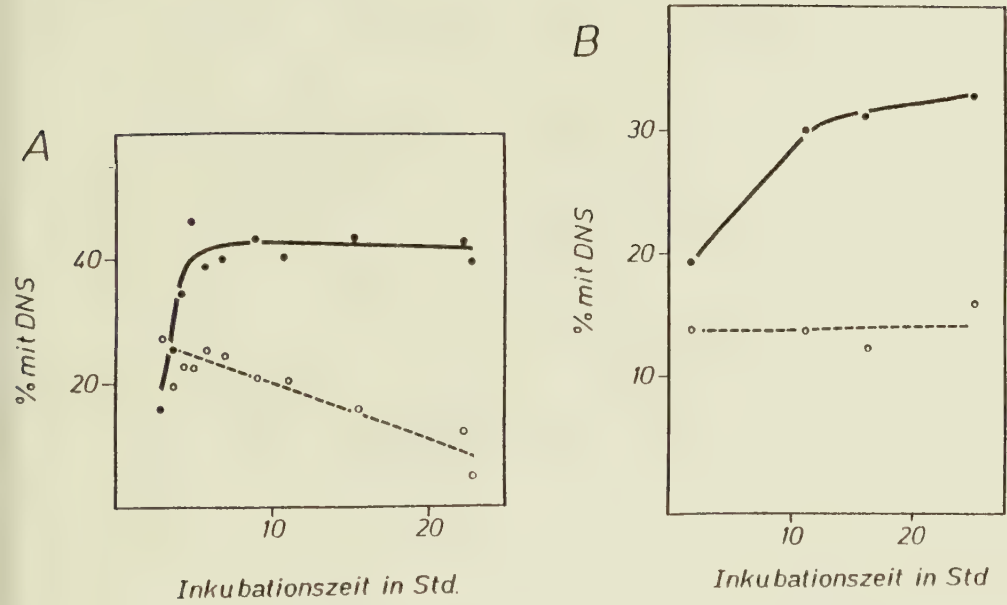


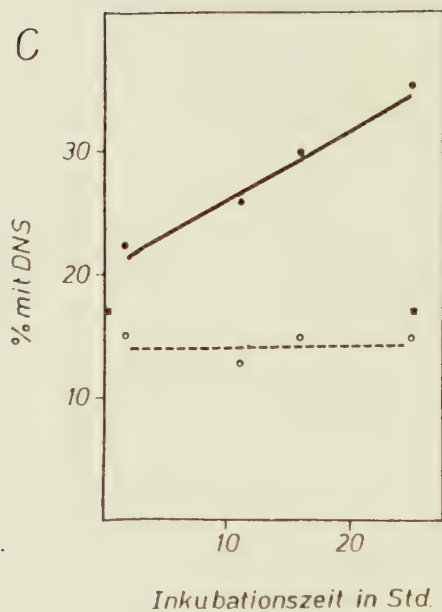
Abb. 24: Kinetik des prozentualen Anteils von mitDNA nach Behandlung der Zellen in nicht vergärbarem Substrat bei nicht permissiver Temperatur.

A: tsm-8; B: tsp-20; C: tsp-25; D: tsp-30.

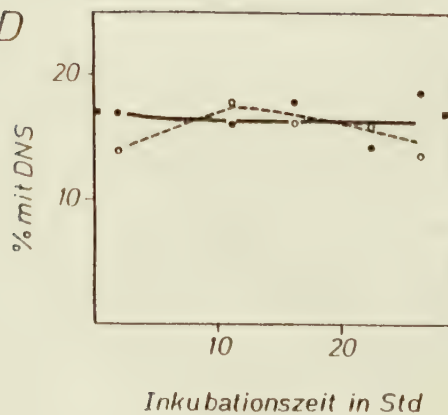
●—● Nachmarkierung mit ^3H -Adenin

o---o Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin

C



D



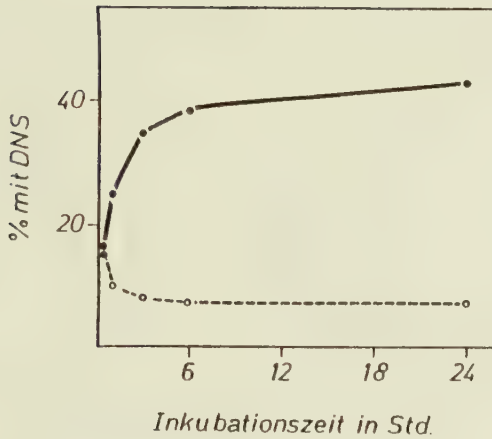


Abb. 25: Kinetik des prozentualen Anteils von mitDNS nach Behandlung der Zellen mit CHI.

●—● Nachmarkierung mit ^3H -Adenin

o---o Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin

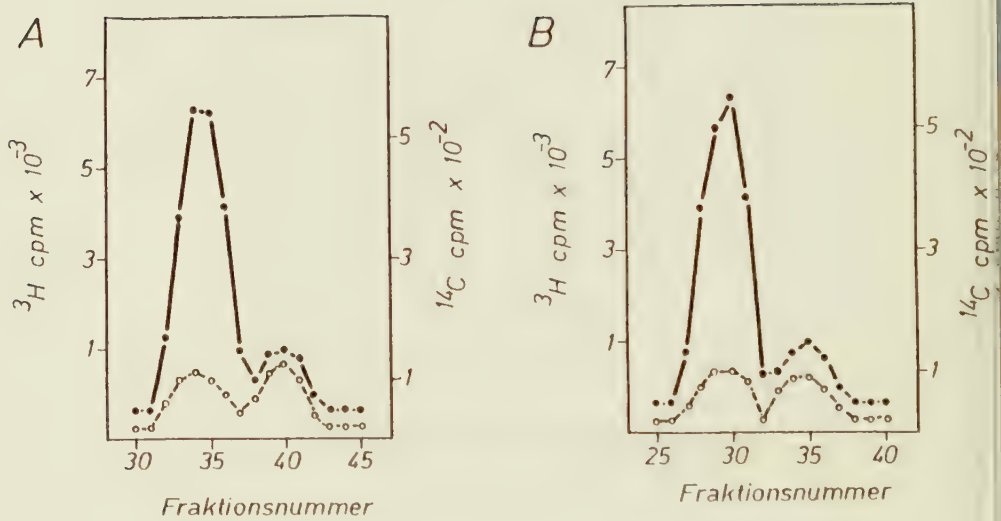


Abb. 26: NaJ-Dichtezentrifugation von totDNS der Mutante tsm-8 nach Wachstum der Zellen bei permissiver Temperatur bis zur stationären Phase.

A: Nachmarkierung 24 Std. nach Versuchsbeginn.

B: Nachmarkierung 48 Std. nach Versuchsbeginn.

●—● Vormarkierung mit ^{14}C -Adenin

o----o Nachmarkierung mit ^3H -Adenin

A1

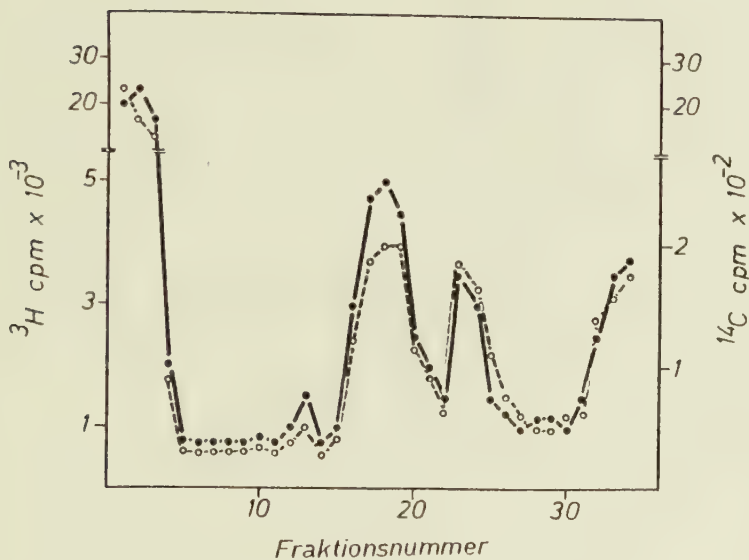
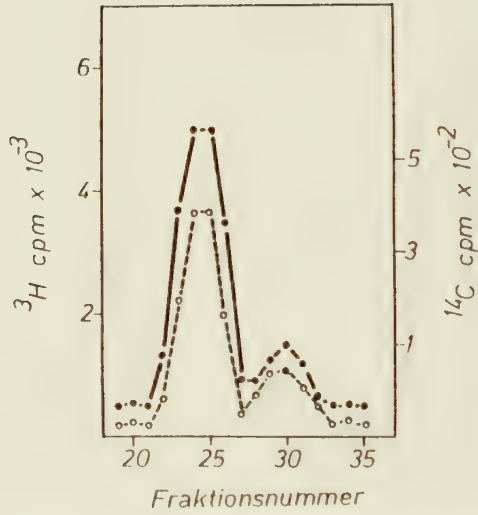
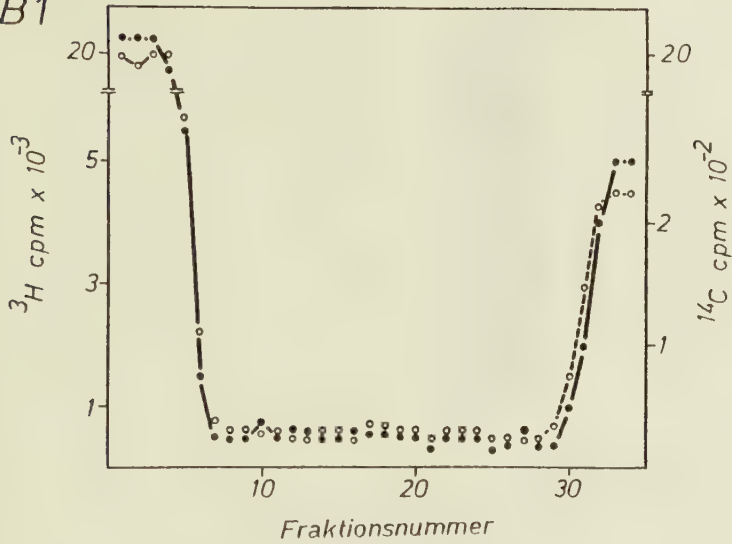


Abb. 27: Charakterisierung der mitDNS der Mutante tsm-8
nach Behandlung der Zellen bei nicht permissiver
Temperatur in nicht vergärbarem Substrat.
A: Markierung bei 23°C mit ^{14}C -Adenin (o---o)
B: Markierung bei 35°C mit ^3H -Adenin (●—●)
1: Sedimentationszentrifugation in Sucrose
2: Dichtezentrifugation in NaJ

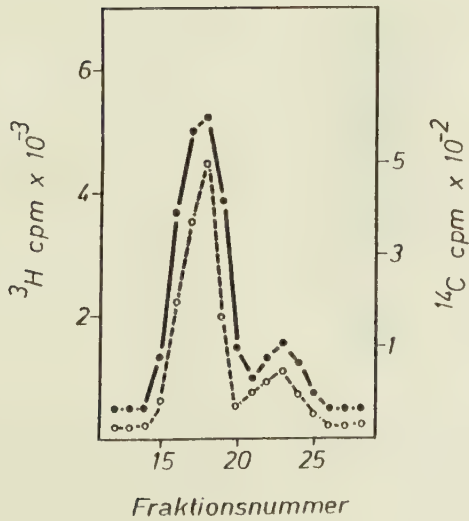
A2



B1



2



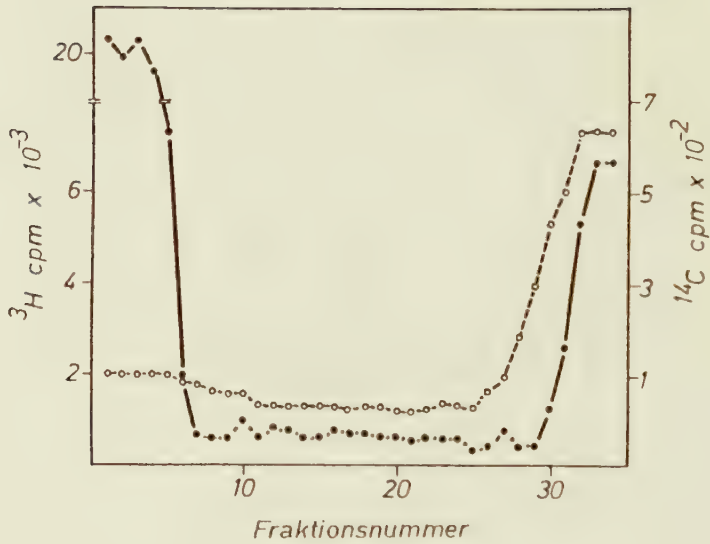


Abb. 28: Sedimentationszentrifugation von mitDNA der Mutante *tam-8* in Sucrose.

●—● Markierung mit ^{14}C -Adenin
o---o Markierung mit ^3H -Leucin

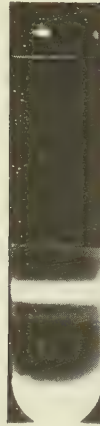


Photo 1: CsCl / Eth. Br. Dichtegradient von nicht gereinigten Mitochondrien. Die obere Bande stellt die mitDNS, die untere die nucDNS dar.



Photo 2: CsCl / Eth. Br. Dichtegradient von nicht gereinigten Mitochondrien.



Photo 3: CsCl / DAPI Dichtegradient von nicht gereinigten Mitochondrien. Die obere Bande stellt mitDNS, die untere nucDNS dar.



Photo 4: NaJ Dichtegradient von nicht gereinigten Mitochondrien. Die obere Bande stellt die mitDNS, die untere nucDNS dar.

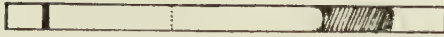


Photo 5: Zeichnung nach einer Photographie der Auftrennung von Hefe-DNS aus Protoplasten im Agarose-Gel. Die Elektrophoresedauer betrug 3 Std. bei 5 mA. Die Wanderungsrichtung ist von links nach rechts.

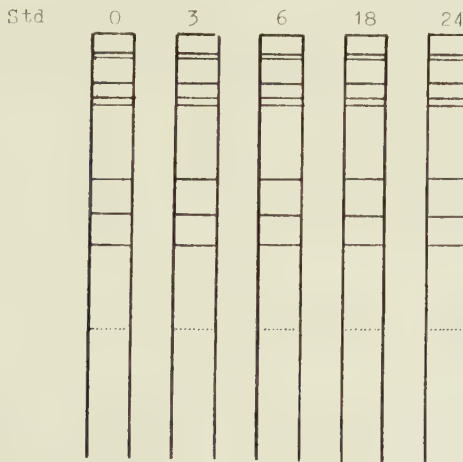


Photo 6: Zeichnung nach einer Photographie der Auftrennung von Restriktionsfragmente der mit DNS der Mutante tsm-8 nach unterschiedlicher Behandlungsdauer bei der nicht permissiven Temperatur in vergärbarem Substrat. Für nähere Angaben vgl. Abschnitt 3.3..

Tabelle 1

Saccharomyces cerevisiae:

M12	KG: a 1lv5 trp2 ura3	MG: -	Hr: Zakar
M12/8	KG: a 1lv5 trp2 ura3	MG: tsm8	Hr: Handwerker et al. (1973)
M12/20	KG: a 1lv5 trp2 ura3 tsp20	MG: -	Hr: Backhaus (1976)
M12/25	KG: a 1lv5 trp2 ura3 tsp25	MG: -	Hr: Backhaus (1976)
M12/30	KG: a 1lv5 trp2 ura3 tsp30	MG: -	Hr: Backhaus (1976)
SM 1211-1B	KG: a 1lv5 trp1	MG: cap321 ery221 tsm8	Hr: Schweyen und Kaudewitz (1976)
SM 551	KG: 2n	MG: tsm8	Hr: Rechmann et al. (1977)
SM 552	KG: 2n	MG: -	Hr: Rechmann et al (1977)
DC6	KG: ura1 ade2	MG: oli1	Hr: Lang et al. (1977)
A 364 A	KG: a leu3 ade2	MG: -	Hr: Lang et al. (1977)

Escherichia coli:

C600 G: thr⁻ leu⁻ thi⁻ su_{III}⁺ (c_I857 Sam7)

Hr: Enquist

Die Phagen DNS (T₄ und P22) sowie die col E1 DNS sind ein Geschenk von Dr. D.Y. Thomas.

Methode	Ausbeute in mg mitProtein / g Zellen
Manuell-mechanisch	3,0
Enzymatisch	3,5

Tab. 2: Ausbeute an mitochondrialem Protein nach Isolierung der Organellen mit verschiedenen Methoden. Die Protein-Bestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1953).

rho ⁻ Stämme	genet. Marker	Hybridisierung	genet. Analyse
G 41	cob ₂₂₈ -oxi ₃ ₂₅₈₂	25	25
G 81	cap-cob ₁₂₈₂	18,1	20 - 35
G 71	cap-cob ₁₂₈₂	24	20 - 35
H 21	cob ₂₀₁ -par	46,2	45 - 60
H 31	tsm ₈ -cap	8,2	8 - 25
G 31	oli ₁ -cob ₂₈₈₁	11,1	5 - 40
G 91	cob ₁₄₃ -cob ₁₂₈₂	13,4	2 - 45
F 6 2	par-oxi ₂ ₂₅₃₂	17	15 - 40
F 6 3	oli ₂ -par	26,2	29 - 57
rho ⁺	cap-cap	100	100

Tab. 3: Genetische und Hybridisierungsanalyse mit isolierten rho⁻ Mutanten. Die Werte sind in % angegeben. Die mitDNS der Mutante wurde durch Agarose-Gele isoliert, mit Hilfe der Southern-Methode (1975) auf Membran-Filter übertragen und gegen rho⁺ mit-c-RNS hybridisiert. Die genetischen Daten wurden durch co-Retention von genetischen Markern in Populationen von rho⁻ Mutanten gewonnen.(Schweyen et al. (1977)).

LITERATURVERZEICHNIS

- Arnberg, A.C.; Van Bruggen, E.F.C.; Clegg, R.A.; Upholt, W.B.;
Forst, P.: An analysis by electron microscopy of interme-
diates in the replication of linear Tetrahymena mito-
chondrial DNA.
Biochim. Biophys. Acta 361 266 - 276 (1974)
- Avner, P.R.; Coen, D.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial
genetics IV. Allelism and mapping studies of oligomycin
resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 125 9 - 52 (1973)
- Backhaus, B.: Mitochondriale Vererbung bei *Saccharomyces cere-*
visiae: Zur Transmission und Rekombination mitochondrialer
Gene in Abhängigkeit von der rho-Mutation in temperatur-
sensiblen Mutanten.
Dissertation München 1976
- Backhaus, B.; Schweyen, R.J.; Dujon, B.; Kaudewitz, F.:
Molec. gen. Genet. (1978) im Druck
- Randlow, W.; Metzke, R.; Klein, A.; Kotzias, K.; Doxiadis, I.;
Rechmann, H.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.: Macromolecular
synthesis and energy level in a mitochondrial conditional
mutant, tsm-8.
Eur. J. Biochem. 76 373 - 382 (1977)
- Rechmann, H.; Krüger, M.; Böker, E.; Schweyen, R.J.; Randlow, W.;
Kaudewitz, F.: On the formation of rho⁻ petites in yeast.
II. Effects of mutation tsm-8 on mitochondrial functions
and rho-factor stability in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 155 41 - 51 (1977)

- Bernardi,G.; Piperno,G.; Fonty,G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA.
J. Mol. Biol. 65 173 - 179 (1972)
- Bernardi,G.; Faures,M.; Piperno,G.; Slonimski,P.P.: Mitochondrial DNA δ from respiratory-sufficient and cytoplasmic-deficient mutant yeast.
J. Mol. Biol. 48 23 - 42 (1970)
- Bishop,J.O.: Molecular hybridization of ribonucleic acid with a large excess of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 126 171 - 185 (1972)
- Blamire,J.; Cryer,D.R.; Finckelstein,D.B.; Marmur,J.: Sedimentation properties of yeast nuclear and mitochondrial DNA.
J. Mol. Biol. 67 11 - 24 (1972)
- Blin,N.; Gabain,A.V.; Bujard,H.: Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for the further digestion by restriction enzymes.
Febs letters 53 84 - 86 (1975)
- Bolotin-Fukuhara,M.; Faye,G.; Fukuhara,H.: Temperature-sensitive respiratory-deficient mitochondrial mutation: isolation and genetic mapping.
Molec. gen. Genet. 152 295 - 305 (1977)
- Borst,P.; Bos,J.L.; Grivell,L.A.; Groot,G.S.P.; Heyting,C.; Moorman,A.F.M.; Sanders,J.P.M.; Tulen,J.L.; Van Kreijl,C.F.; Van Ommen,G.J.B.: The physical map of yeast mitochondrial DNA anno 1977.

- In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria
Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.
de Gruyter, Berlin New York (1977)
- Butow, R.A.; Ferguson, M.J.; Cederbaum, A.: Low temperature induction of respiratory deficiency in yeast.
Biochemistry 12 1331 - 1333 (1973)
- Butow, R.A.; Vincent, R.D.; Strausberg, R.L.; Zanders, E.;
Perlman, P.S.: Genetic, physical and biochemical analysis of mitochondrial gene.
In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria
Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.
de Gruyter, Berlin New York (1977)
- Gabral, P.; Golios, M.; Rudin, Y.; Schatz, G.; Clavillier, D.;
Slonimski, P.P.: Identification of the structural gene for yeast cytochrom c oxidase subunit II of mitochondrial DNA.
- Christiansen, C.; Christiansen, G.; Leth Bak, A.: Heterogeneity of mitochondrial DNA from *Saccharomyces carlsbergensis*: renaturation and sedimentation analysis.
J. Mol. Biol. 84 65 - 82 (1974)
- Collins, J.: Gene cloning with colE1 plasmid and colE1 chimaera plasmids.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357 311 - 312 (1976)
- De Kloet, S.R.; Andrean, B.A.G.: Boyant density gradient zentrifugation of RNA and DNA in alkali iodide solutions.
Biochim. Biophys. Acta 247 519 - 527 (1971)

Dujon, B.; Michaelis, G.: V. Extrakaryotic inheritance.

In: Fortschritte der Botanik 36

Herausgeber: Ellenberg, H.; Esser, K.; Merxmüller, H.; Schrepf, E.;
Ziegler, H.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1974) 236

Faye, G.; Fukuhara, H.; Grandchamp, C.; Laskowska, J.; Michel, F.;

Casey, J.; Getz, G.S.; Locker, J.; Rabinowitz, M.; Bolotin-

Fukuhara, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.;

Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in petite
colonie mutants: deletion and repetition of genes.

Biochimie 55 779 - 792 (1973)

Freifelder, D.: Molecular weights of coliphages and coliphage

DNA. IV Molecular weight of DNA from bacteriophages T₄, T₅
and T₇ and the general problem of determination of M.

J. Mol. Biol. 54 567 - 577

Goldring, E.S.; Grossman, L.J.; Krupnik, D.; Cryer, D.R.; Marmur, J.:

The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxy-
ribonucleic acid during induction of petites with ethidium
bromide.

J. Mol. Biol. 52 323 - 335 (1970)

Grossman, L.J.; Goldring, E.S.; Marmur, J.: Preferential synthesis

of yeast mitochondrial DNA in the absence of protein syn-
thesis.

J. Mol. Biol. 46 367 - 376 (1969)

Grosch, G.; Doxiadis, J.; Lang, B.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.:

A one-step methode for rho⁺ cRNA/rho⁻ DNA hybridization

in mapping of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*.

In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria
Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.
de Gruyter Berlin, New York (1977) pp. 425 - 432

Handwerker, A.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.: Evidence
for an extrakaryotic mutation affecting the maintenance of
the rho factor in yeast.

J. of Bact. 139 1307 - 1310 (1973)

Hollenberg, C.P.; Borst, P.; Van Bruggen, E.F.J.: Mitochondrial
DNA V. A 25u closed circular duplex DNS molecule in wild-
type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity.
Biochim. Biophys. Acta 209 1 - 15 (1970)

Kasamatsu, H.; Vinograd, J.: Unidirectionality of replication
in mouse mitochondrial DNA.

Nature New Biology 241 103 - 105 (1973)

Kasamatsu, H.; Vinograd, J.: Replication of circular DNA in
eukaryotic cells.

Annu. Rev. Biochem. 43 695 - 719 (1974)

Kováč, L.; Groot, G.S.P.; Racker, E.: Translocation of protons
and potassium ions across the mitochondrial membrane of
respiring and respiration-deficient yeasts.

Biochim. Biophys. Acta 256 55 - 65 (1972)

Kutzleb, R.; Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.: Extrachromosomal
inheritance of paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 125 91 - 98 (1973)

- Lang,B.; Burger,G.; Doxiadis,I.; Thomas,D.Y.; Bandlow,W.;
Kaudewitz,F.: A simple Method for the large scale pre-
paration of mitochondria from microorganisms.
Anal. Biochem. 77 110 - 121 (1977)
- Lewin,A.; Morimoto,R.; Merten,S.; Martin,N.; Berg,P.;
Christianson,T.; Levens,D.; Rabinowitz,M.: Physical
mapping of mitochondrial genes and transcripts in
Saccharomyces cerevisiae.
In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria
Bandlow,W.; Schweyen,R.J.; Wolf,K.; Kaudewitz,F. eds.
de Gruyter Berlin, New York (1977) pp. 271 - 289
- Linnane,A.W.; Lukins,H.B.; Molloy,P.L.; Nagley,P.; Rytka,J.;
Sriprakash,K.S.; Trembach,M.K.: Biogenesis of mitochondria:
Molecular mapping of the mitochondrial genome in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 2082 - 2085 (1976)
- Locker,J.; Rabinowitz,M.; Getz,G.S.: Tandem inverted repeats
in mitochondrial DNA of petite mutants of *Saccharomyces*
cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 1366 - 1370 (1974 a)
- Locker,J.; Rabinowitz,M.; Getz,G.S.: Elektron microscopic
and renaturation kinetic analysis of mitochondrial DNA
of cytoplasmic petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Mol. Biol. 88 489 - 507 (1974 b)
- Lowry,O.H.; Rosenbrough,N.J.; Farr,A.L.; Randall,R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 265 - 275 (1951)

Nagley, P.; Linnane, A.: Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 39 989 - 996 (1970)

Newlon, C.S.; Fangman, W.L.: Mitochondrial DNA synthesis in cell-cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.

Cell 5 423 - 428 (1975)

Petes, T.D.; Byers, R.; Fangman, W.L.: Size and structure of yeast chromosomal DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 3072 - 3076 (1973)

Petes, T.D.; Fangman, W.L.: Preferential synthesis of yeast mitochondrial DNA in alpha-factor arrested cells.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 55 603 - 609 (1973)

Prunell, A.; Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. VI. Genome organisation.

J. Mol. Biol. 110 53 - 74 (1977)

Prunell, A.; Kopecka, H.; Strauss, F.; Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. V. Genome evolution.

J. Mol. Biol. 110 17 - 52 (1977)

Rabinowitz, M.; Jankovic, S.; Martin, N.; Hendler, F.; Halbreich, A.; Lewin, A.; Morimoto, R.: Transcription and organisation of yeast mitochondrial DNA.

In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA

Saccone, C. and Kroon, A.M. eds.

Elsevier / North-Holland Biomedical Press Amsterdam (1976)
pp. 219 - 230

Sanders, J.P.M.; Borst, P.; Weijers, P.J.: The organisation of genes in yeast mitochondrial DNA II. The physical map of

Eco RI and Hind II + III fragments.

Molec. gen. Genet. 143 53 - 64 (1975)

Sanders, J.P.M.; Heyting, C.; Di Franco, A.; Borst, F.; Slonimski, P.P.: The organisation of genes in yeast mitochondrial DNA.

In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA

Saccone, C. and Kroon, A.M. eds.

Elsevier / North-Holland Biomedical Press Amsterdam (1976)

pp. 259 - 272

Schweyen, R.J.; Kaudewitz, F.: On the formation of rho⁻ petites in yeast. I Multifactorial mitochondrial crosses (rho⁺ x rho⁺) involving a mutation conferring temperature sensitivity of the rho factor stability.

Molec. gen. Genet. 149 311 - 322 (1976)

Schweyen, R.J.; Weiss-Brummer, B.; Backhaus, B.; Kaudewitz, F.:

The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of COB and OXI3 clusters.

In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria

Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.

de Gruyter Berlin, New York (1977) pp. 139 - 148

Schatz, G.; Kováč, L.: Isolation of promitochondria from anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*.

Methods of Enzymology 31 627 - 632 (1974)

Schweyen, R.J.; Weiss-Brummer, B.; Backhaus, B.; Kaudewitz, F.:

Map positions of drug^r and mit⁻ markers as revealed from population analyses of rho⁻ clones in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 159 151 - 160 (1978)

- Slonimski, P.P.; Tzagoloff, A.: Localisation in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrom oxidase and / or coenzym QH₂-cytochrome c reductase. Eur. J. Biochem. 61 27 - 41 (1976)
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 503 - 517 (1975)
- Stevens, B.J.: Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution. Biol. Cellulaire 28 37 - 56 (1977)
- Takahashi, M.; Ogino, T.; Baba, K.: Estimation of the relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gels. Biochim. Biophys. Acta 174 183 - 187 (1969)
- Tanaka, T.; Weissblum, R.: Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid in vitro: Means for amplification of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 121 354 - 362 (1975)
- Thomas, D.Y.; Wilkie, D.: Inhibition of mitochondrial synthesis in yeast by erythromycin: Cytoplasmic and nuclear factors controlling resistance. Genet. Res. 11 33 - 41 (1968)
- Thuring, R.W.J.; Sanders, J.P.M.; Borst, P.: A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Analyt. Biochemistry 66 213 - 220 (1975)
- Tzagoloff, A.; Akai, A.; Needleman, R.B.: Properties of cytoplasmic

mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific lessions in cytochrome oxidase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 2054 - 2057 (1975)

Wachter, E.; Sebald, W.; Tzagoloff, A.: Altered amino acid sequence of the DCCD-binding protein in the oli-1 resistant mutant D273-10B/A21 of *Saccharomyces cerevisiae*.

In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds. de Gruyter Berlin, New York (1977) pp. 441 - 449

Weislogel, P.O.; Butow, R.A.: Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 52 - 58 (1970)

Weislogel, P.O.; Butow, R.A.: Control of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. The fate of mitochondrial membrane proteins and mitochondrial deoxyribonucleic acid during petite induction.

J. Biol. Chem. 246 5113 - 5119 (1971)

Williamson, D.H.; Fenell, D.J.: The use of DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA.

In: Methods in cell biology Vol 12

Prescott, D.M. ed.

Academic Press New York (1975) pp. 335 - 351

Williamson, D.H.; Johnston, L.H.; Richmond, K.M.V.; Game J.C.:

Mitochondrial DNA and the heritable unit of the yeast mitochondrial genome: A review.

In: Mitochondria 1977. Genetics and Biogenesis of Mitochondria Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.

de Gruyter Berlin, New York (1977) pp. 1 - 24

- Williamson, D.H.; Moustacchi, E.; Fenell, D.: A procedure for rapidly extracting and estimating the nuclear and cytoplasmic DNA components of yeast cells.
Biochim. Biophys. Acta 238 369 - 374 (1971)
- Wintersberger, U.; Hirsch, J.; Fink, A.M.: Studies on nuclear and mitochondrial DNA-replication in a temperature sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 131 291 - 299 (1974)
- Wolf, K.; Dujon, B.; Slonimski, P.P.: Mitochondrial genetics V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 125 53 - 90 (1973)

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Charakterisierung der mitDNS der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae wurden Methoden untersucht bzw. neue entwickelt:

- 1) Für den Zellaufschluß eignen sich für präparative Ansätze die manuell-mechanische-Methode, für analytische dagegen sowohl die oben genannte wie auch enzymatische Methoden.
- 2) Trennung der DNS-Arten mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation kann mit NaJ oder CsCl / DAPI erreicht werden. Letztere Methode kann mit Erfolg dann angewendet werden, wenn das Molekulargewicht der zu isolierenden DNS von untergeordneten Bedeutung ist.
- 3) Sedimentations-Zentrifugation in Sucrose-Gradienten bieten eine gute Möglichkeit für die Isolierung von mitDNS. Die Methode liefert wegen der Überladung des Gradienten relativ geringe Mengen an DNS.
- 4) Die neu entwickelte Agarose-Gel-Methode kann sowohl für präparative wie auch für analytische Zwecke angewandt werden, da sie mitDNS hoher Reinheit, mit geringen Brüchen der Doppelstränge und mit guter Ausbeute liefert.
- 5) Vier untersuchte konditionelle Mutanten (tsm-8; tsp-20; tsp-25 und tsp-30) weisen alle mitDNS Synthese bei nicht permissiver Temperatur auf. Die Replikation ist fehlerfrei. Nach Behandlung der Zellen in nicht vergärbarem Substrat konnte eine Erhöhung des Molekulargewichts festgestellt werden.
- 6) Die ρ^- Bildung dieser Mutanten ist durch Deletionen von mitDNS Sequenzen verursacht. Die Deletionen sind durchgehend,

von unterschiedlicher Länge und über das gesamte Genom verteilt. Die zurückbehaltenen Sequenzen sind ebenfalls durchgehend, d.h. ohne interne Deletionen.

- 7) Als primäre Ursache der ρ^- Bildung wird die Beendigung der Replikation der mitDNS diskutiert und daraus ein Modell der ρ^- Mutagenese abgeleitet.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1974 bis September 1977 am Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Am Ende der Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben, mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Anregung und Förderung der Arbeit, Herrn Dr. R.J. Schweyen und Herrn Dr. D.Y. Thomas für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung, Herrn Dr. B. Lang, Fr. Diplombiologe A.R. Gessner Fr. Diplombiologe M.T. Schwieters für anregende Diskussionsbereitschaft, Fr. Diplombiologe G. Grosch für die Bereitstellung der Hybridisierungsergebnisse sowie für ihre Hilfe bei der Fertigstellung des vorliegenden Manuskripts
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung von Geldmitteln.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 12. Februar 1950 in Alexandria, Ägypten geboren. Meine Eltern sind Dimos Doxiadis und Rosa Maria Cangelaris. Von 1955 - 1961 besuchte ich die Volksschule Aristophronios in Alexandria und wechselte dann auf das Averov-Gymnasium, wo ich das griechische Abitur ablegte. Von 1968 - 1976 studierte ich Biologie an der Universität München. Juli 1973 legte ich die mündliche Diplomprüfung ab, anschließend fertigte ich bis Juli 1976 meine Diplomarbeit am Genetischen Institut in München ab. Ab Mai 1974 arbeite ich am Genetischen Institut unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz an der vorliegenden Arbeit. Seit September 1974 bin ich mit Birgitta Doxiadis , geborene Leiderstam verheiratet.

